

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-518471
(P2015-518471A)

(43) 公表日 平成27年7月2日(2015.7.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/42 (2006.01)	C07K 16/42 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4H045
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543 545A	
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88 J	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-503347 (P2015-503347)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月15日 (2013. 3. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月26日 (2014. 11. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/032661
 (87) 国際公開番号 W02013/148373
 (87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/616, 914
 (32) 優先日 平成24年3月28日 (2012. 3. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ホンゴ, ジョーアン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ディーエヌエー ウェイ 1

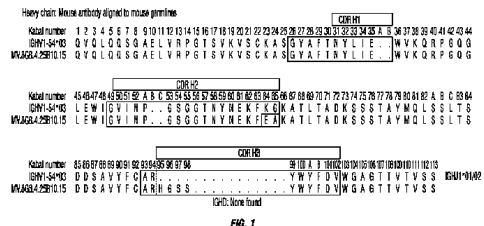
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HCMVイデオタイプ抗体およびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、抗イデオタイプHCMV抗体、並びに前述のものを使用する方法を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体または配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する単離された抗イディオタイプ抗体。

【請求項 2】

抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する、請求項1の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 3】

抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する、請求項1の抗イディオタイプ抗体。

10

【請求項 4】

前記抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み：

(a) HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；

(b) HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；

(c) HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；

(d) HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；

(e) HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および、

(f) HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む、請求項2の抗イディオタイプ抗体。

20

【請求項 5】

前記抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む、請求項4の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 6】

前記抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2、およびHVR-L3）を含み：

(a) HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；

(b) HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；

(c) HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；

(d) HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；

(e) HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および、

(f) HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む、請求項3の抗イディオタイプ抗体。

30

【請求項 7】

前記抗イディオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む、請求項6の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 8】

前記抗イディオタイプ抗体は、前記配列番号：1の重鎖配列および前記配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに特異的に結合する、請求項2の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 9】

前記抗イディオタイプ抗体は、前記配列番号：3の重鎖配列および前記配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに特異的に結合する、請求項3の抗イディオタイプ抗体。

40

【請求項 10】

前記抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体のHVR-H2（配列番号：36）に特異的に結合する、請求項3の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 11】

検出可能な標識に抱合された、請求項1の抗イディオタイプ抗体。

【請求項 12】

50

ビオチンに抱合された、請求項1の抗体。

【請求項13】

関心対象の抗体を特異的に生物学的試料において検出するための酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法であって、(a)前記生物学的試料を捕獲試薬と接触すること、およびインキュベートすることであって、前記捕獲試薬は、前記試料に存在する関心対象の抗体のいずれかを結合するように、請求項1の抗イディオタイプ抗体であること、および(b)前記捕獲試薬およびそれ故、関心対象の任意の結合抗体を前記関心対象の抗体に結合する検出可能な抗体と接触すること、および検出可能な抗体のための検出手段を使用して前記抗イディオタイプ抗体に結合した前記関心対象の抗体のレベルを測定することを含み、前記関心対象の抗体は、(a)配列番号:1の重鎖配列および配列番号:2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体; (b)配列番号:3の重鎖配列および配列番号:4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体; および(c)これらの組み合わせから選択される方法。

10

【請求項14】

前記捕獲試薬は、固体支持体に固定され、および前記方法は、存在する関心対象の抗体のいずれかに結合した前記固定化された捕獲試薬から前記生物学的試料を分離する工程をさらに含む、請求項13の方法。

【請求項15】

前記固定化された捕獲試薬は、マイクロタイタープレート上に被覆される、請求項14の方法。

【請求項16】

前記固定化された捕獲試薬は、ビオチンに抱合され、およびストレプトアビジン被覆されたマイクロタイタープレートに結合される、請求項14の方法。

20

【請求項17】

前記検出可能な抗体は、ヒト抗体に結合する非ヒト種由来の抗体である、請求項16の方法。

【請求項18】

前記検出可能な抗体は、マウス抗hulgG Fc 抗体である、請求項17の方法。

【請求項19】

前記検出可能な抗体は、直接検出可能である、請求項17または18の方法。

【請求項20】

前記検出可能な抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合される、請求項17または18の方法。

30

【請求項21】

前記検出可能な抗体は、蛍光または熱量測定試薬によって検出される、請求項17または18の方法。

【請求項22】

関心対象の抗体を特異的に生物学的試料において検出するための方法であって:(a)前記生物学的試料を前記関心対象の抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と接触すること、およびインキュベートすること;(b)前記試料を前記抗イディオタイプ抗体に結合する免疫親和性ビーズと接触すること、およびインキュベートすること;(c)前記関心対象の抗体を溶出させること;(d)前記溶出された関心対象の抗体を分離媒体に適用して、1つ以上の試料成分の分離を行うことであって、前記分離された試料成分は、前記関心対象の抗体またはその断片もしくはサインペプチドを含むこと;および(e)質量分析によって1つまたは複数の分離された試料成分の質量電荷比を確立することを含み、前記関心対象の抗体は、(a)配列番号:1の重鎖配列および配列番号:2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体;(b)配列番号:3の重鎖配列および配列番号:4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体;および(c)これらの組み合わせから選択される方法。

40

【請求項23】

前記免疫親和性ビーズとのインキュベーション後に、および前記関心対象の抗体を溶出する前に、またはその後プロテアーゼで前記生物学的試料を処理することをさらに含む

50

、請求項22の方法。

【請求項 2 4】

前記プロテアーゼは、トリプシンである、請求項23の方法。

【請求項 2 5】

前記抗イディオタイプ抗体は、ビオチン化される、請求項22の方法。

【請求項 2 6】

前記抗イディオタイプ抗体は、ストレプトアビジン被覆した常磁性免疫親和性ビーズに結合する、請求項25の方法。

【請求項 2 7】

前記抗イディオタイプ抗体は、前記生物学的試料との接触およびインキュベーションの前に前記免疫親和性ビーズに結合される、請求項26の方法。

10

【請求項 2 8】

前記免疫親和性ビーズは、磁気ビーズである、請求項22の方法。

【請求項 2 9】

前記分離媒体は、クロマトグラフィー支持体である、請求項22の方法。

【請求項 3 0】

前記関心対象の抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および前記抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項 3 1】

前記関心対象の抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）、および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み：

20

(a) HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；

(b) HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；

(c) HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；

(d) HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；

(e) HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および、

(f) HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

30

【請求項 3 2】

前記抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項 3 3】

前記関心対象の抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項 3 4】

前記関心対象の抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および前記抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2、およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2、およびHVR-L3）を含み：

40

(a) HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；

(b) HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；

(c) HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；

(d) HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；

(e) HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および、

(f) HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項 3 5】

50

前記抗イデオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項36】

前記関心対象の抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および前記抗イデオタイプ抗体は、前記抗HCMV抗体のHVR-H2（配列番号：36）に特異的に結合する、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項37】

前記関心対象の抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体であり、および（b）配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体である、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

10

【請求項38】

前記抗イデオタイプ抗体は、前記関心対象の抗体に結合し、前記試料における少なくとも1つのその他の抗HCMV抗体には結合しない、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項39】

前記生物学的試料は、ヒト被験者から単離される、請求項13～18および22～29のいずれか1項の方法。

【請求項40】

前記ヒト被験者は、（a）配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体；（b）配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体；並びに（c）これらの組み合わせから選択される抗HCMV抗体で治療されている、請求項39の方法。

20

【請求項41】

前記方法は、公知のレベルと比較して前記関心対象の抗体のレベルを決定するために標準曲線を使用することをさらに含む、請求項13～18、22～29および40のいずれか1項の方法。

【請求項42】

前記生物学的試料は、血液、血漿または血清である、請求項13～18、22～29および40のいずれか1項の方法。

【請求項43】

前記試料は、血清である、請求項41の方法。

30

【請求項44】

（a）配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体；（b）配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体；および（c）これらの組み合わせから選択される関心対象の抗体を生物学的試料中で特異的に検出するための免疫アッセイキットであって、前記キットは：（a）捕獲試薬として、前記関心対象の抗体に特異的に結合する抗イデオタイプ抗体を含む容器；（b）前記関心対象の抗体に結合する検出可能な抗体を含む容器；および（c）前記関心対象の抗体を検出するための説明書を含む、キット。

【請求項45】

前記関心対象の抗体を検出するためのELISA法において有用な、請求項44のキット。

40

【請求項46】

前記捕獲試薬のための固体支持体をさらに含む、請求項45のキット。

【請求項47】

前記捕獲試薬は、前記固体支持体上に固定される、請求項46のキット。

【請求項48】

前記捕獲試薬は、マイクロタイタープレート上に被覆される、請求項47のキット。

【請求項49】

前記抗イデオタイプ抗体は、（a）配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む第1の抗イデオタイプ抗体；（b）配列番号：9の重鎖配列および配列番号：1

50

1の軽鎖配列を含む第2の抗イディオタイプ抗体；および(c)これらの組み合わせから選択される、請求項44のキット。

【請求項50】

番号：13～24からなる群より選択される少なくとも1つの重鎖超可変領域を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する単離された抗イディオタイプ抗体。

【請求項51】

3つの重鎖超可変領域(HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3)および3つの軽鎖超可変領域(HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3)を含み：

- (a) HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；
- (b) HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；
- (c) HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；
- (d) HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；
- (e) HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および、
- (f) HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む、請求項50の抗体。

10

【請求項52】

3つの重鎖超可変領域(HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3)および3つの軽鎖超可変領域(HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3)を含み：

- (a) HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；
- (b) HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；
- (c) HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；
- (d) HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；
- (e) HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および、
- (f) HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む、請求項50の抗体。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗HCMVイディオタイプ抗体および前述のものを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)は、ヘルペスウイルスであり、およびヒトヘルペスウイルス-5(HHV-5)としても知られる。マウスCMV(MCMV)、モルモットCMV(GPCMV)、サルCMV(SCCMV)、アカゲザルCMV(rhCMV)およびチンパンジーCMV(CCMV)などの、さらなる哺乳類に感染するサイトメガロウイルス(CMV)のその他の種が存在する。HCMVは、米国人口のほぼ50%に感染する一般的なヘルペスウイルスである。大多数のヒト感染個体にとって、HCMV感染は、無症候性である。しかし、疾病および免疫抑制(たとえば、HIV感染症、移植患者における薬物で誘導される免疫抑制)の状態において、HCMV再活性化または一次感染は、単核球症、肝炎、網膜炎、肺炎、失明および臓器不全などの多様な臨床症状を引き起こす。加えて、妊娠の状況において、一次CMV感染の罹患は、母親にとってあまり重大ではないが、発達中の胎児において重篤な臨床結果を有し得る。

30

【0003】

妊娠中に感染した母親に生まれる多くの子供は、子宮内で感染し、および破壊的な臨床的疾患に罹患するため、先天性HCMV感染は、特に重大である。米国および欧州において、126,000人の女性が妊娠中に一次HCMV感染を有し、およびこれらの母に生まれた乳児のおよそ40,000人が先天性感染を有する。米国において、750人に1人の子供が、HCMV感染のために、精神遅滞、聴力損失、視力喪失、器官欠損および成長欠陥を含む障害を有し、または発症する。先天性HCMV感染は、胎児異常で最も一般的な感染原因である。妊婦の一次感染が生じた後に、胎児感染の予防または治療のための承認された療法は、現在ない。

40

【0004】

2005年に、Nigroおよび同僚は、ヒトCMV過免疫グロブリン(HIG)を、一次HCMV感染を伴う妊婦に投与した研究を公開した(Nigro et al. (2005) New Engl. J. Med. 353:1350

50

-1362)。研究の一群において、HCMV感染した母に生まれた31人の乳児のうちのわずか1人が、疾患を伴って生まれたが、未治療の女性に生まれた子供の7/14(50%)が、HCMV疾患を伴って生まれた。同上。

【0005】

妊娠中に、HCMVは、胎盤を介して感染した母から胎児に広がり得る。胎児を子宮に固定する胎盤は、分化した上皮細胞、間質線維芽細胞、内皮細胞および分化したマクロファージを含む。HCMVウイルスの表面は、種々のウイルスの糖タンパク質複合体を含み、これは胎盤において見いだされる特定の細胞型の感染のために必要とされることが示されている。gH/gLおよびUL128、UL130およびUL131を含むCMV糖タンパク質の複合体(本明細書において「複合体I」という)は、内皮細胞、上皮細胞およびマクロファージ感染のために特異的に必要とされる。gH/gLおよびgOを含むCMV糖タンパク質の複合体(本明細書において「複合体II」という)は、線維芽細胞の感染のために特異的に必要とされる。HIGは、HCMV感染に感受性である胎盤細胞型の4つ全てへのウイルスの進入を遮断することが示されている。

10

【0006】

HIGを調製すること、および広く分配することの難しさ、並びにヒト血液製剤を、特に妊婦において、使用することに対する医師および医療共同体の抵抗のため、胎児を先天性HCMV感染から保護することができるモノクローナル抗体またはモノクローナル抗体群を含む組成物を作製することは、最も有益だろう。CMVの母体胎児間感染の予防のために、モノクローナル抗体組成物は現在まで開発されていなかった。LanzavecchiaおよびMacagnoは、CMV伝染を中和するUL130およびUL131の組み合わせまたはUL128、UL130およびUL131の組み合わせから生じる高次構造エピトープに結合する感染患者の不死化されたB細胞から単離された天然に存在する抗体を開示した(米国特許公開第2008/0213265号および第2009/0081230号)。ShenkおよびWangは、Complex Iのタンパク質に結合する抗体を開示した(米国特許第7,704,510号)。また、Funaroらは、米国特許公開第2010-0040602号において、CMVに対する中和抗体を開示する。加えて、抗gHモノクローナル抗体、MSL-109を、2つの患者集団、同種間骨髄移植レシピエントとAIDSおよびCMV網膜炎を伴う患者とにおいて、ヒトにおいて試験した(Drobyski et al., Transplantation 51:1190-1196 (1991); Boeckh et al., Biol. Blood Marrow Transplant. 7:343-351 (2001); および Borucki et al., Antiviral Res. 64:103-111 (2004)が、成功しなかった。

20

30

【0007】

米国特許出願第13/248,998号は、その全体が本明細書に参照により援用され、ヒト化抗HCMVモノクローナル抗体を開示する。米国特許出願第13/248,998号において開示された抗体は、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞およびマクロファージに対する感染の阻害について、HCMV(HIG)に感染した患者からのヒト免疫グロブリンと同等の中和強度を有することを示した。これらの抗体は、たとえばHCMV感染、先天性HCMV感染およびHCMV感染した移植組織を介した患者の感染の予防、阻害および/または治療のために有用である。

【0008】

当該技術分野において、生物学的試料および/または臨床試料におけるHCMVに対する治療的ヒト化モノクローナル抗体を、またHCMVに対して作られた、または作られないその他の抗体(たとえば、内因性免疫グロブリン)を検出することなく、検出することに対する需要がある。本発明は、一定の抗HCMV抗体を特異的に検出する抗イディオタイプ抗体を提供する。これらの抗体は、たとえば、薬物動態学的(PK)および薬力学的研究において、並びに患者における治療的抗HCMV抗体の定量化およびモニタリングのために有用である。

40

【発明の概要】

【0009】

本発明は、抗HCMVモノクローナル抗体に特異的に結合する単離された抗イディオタイプ抗体を提供する。一つの態様において、本発明は、配列番号:1の重鎖配列および配列番号:2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する単離された抗イディオタイプ抗体または配列番号:3の重鎖配列および配列番号:4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体を提供する

50

。

【0010】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体からの全6つのHVRを含む抗HCMV抗体に特異的に結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み、（a）HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；（b）HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；（c）HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；（d）HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；（e）HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および（f）HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む。

10

【0011】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体からの全6つのHVRを含む抗HCMV抗体に特異的に結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み、（a）HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；（b）HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；（c）HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；（d）HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；（e）HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および（f）HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む。

20

【0012】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに特異的に結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに特異的に結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体のHVR-H2（配列番号：36）に特異的に結合する。

30

【0013】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27および配列番号：28から選択されるアミノ酸配列がアミノ酸内に含まれるエピトープに結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：25または配列番号：26から選択されるアミノ酸配列がアミノ酸内に含まれるエピトープに結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：27または配列番号：28から選択されるアミノ酸配列がアミノ酸内に含まれるエピトープに結合する。

40

【0014】

いくつかの態様において、上記の抗イディオタイプ抗体のいずれか1つは、検出可能な標識に抱合される。いくつかの態様において、上記の抗イディオタイプ抗体のいずれか1つは、ビオチンに抱合される。

【0015】

本発明は、本発明の抗イディオタイプ抗体を使用する検出の方法をさらに提供する。一つの態様において、本発明は、関心対象の抗体を生物学的試料において特異的に検出するための酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）法であって、（a）生物学的試料を捕獲試薬と接触すること、およびインキュベートすることであって、捕獲試薬は、試料に存在する関心対象の抗体のいずれかを結合するように、請求項1の抗イディオタイプ抗体であること、および（b）捕獲試薬およびそれ故、関心対象の任意の結合抗体を関心対象の抗体に結

50

合する検出可能な抗体と接触すること、および検出可能な抗体のための検出手段を使用し、抗イディオタイプ抗体に結合した関心対象の抗体のレベルを測定することを含み、関心対象の抗体は、(a) 配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体；(b) 配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体；および(c) これらの組み合わせから選択される方法を提供する。

【0016】

本方法のいくつかの態様において、捕獲試薬は、固体支持体に固定され、および本方法は、関心対象の抗体のいずれかに結合した固定化された捕獲試薬から生物学的試料を分離する工程をさらに含む。いくつかの態様において、固定化された捕獲試薬は、マイクロタイタープレート上に被覆される。いくつかの態様において、固定化された捕獲試薬は、ピオチンに抱合され、およびストレプトアビジン被覆したマイクロタイタープレートに結合される。

10

【0017】

本方法のいくつかの態様において、検出可能な抗体は、ヒト抗体に結合する非ヒト種由来の抗体である。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、マウス抗hulgG Fc 抗体である。

【0018】

本方法のいくつかの態様において、検出可能な抗体は、直接検出可能である。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合される。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、蛍光または熱量測定試薬によって検出される。

20

【0019】

本発明は、関心対象の抗体を生物学的試料において特異的に検出するための方法であって：(a) 生物学的試料を関心対象の抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体と接触すること、およびインキュベートすること；(b) 試料を抗イディオタイプ抗体に結合する免疫親和性ビーズと接触すること、およびインキュベートすること；(c) 関心対象の抗体を溶出すること；(d) 溶出された関心対象の抗体を分離媒体に適用して、1つ以上の試料成分の分離を行うことであって、分離された試料成分は、関心対象の抗体またはその断片もしくはサインペプチドを含むこと；および(e) 質量分析によって1つまたは複数の分離された試料成分の質量電荷比を確立することを含み、関心対象の抗体は、(a) 配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体；(b) 配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体；および(c) これらの組み合わせから選択される方法をさらに提供する。

30

【0020】

いくつかの態様において、本方法は、免疫親和性ビーズとのインキュベーション後に、および関心対象の抗体を溶出する前に、またはその後プロテアーゼで生物学的試料を処理することをさらに含む。いくつかの態様において、プロテアーゼは、トリプシンである。

【0021】

本方法のいくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、ピオチン化される。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、ストレプトアビジン被覆した常磁性免疫親和性ビーズに結合する。

40

【0022】

本方法のいくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、生物学的試料との接触およびインキュベーションの前に免疫親和性ビーズに結合される。

【0023】

本方法のいくつかの態様において、免疫親和性ビーズは、磁気ビーズである。

【0024】

本方法のいくつかの態様において、分離媒体は、クロマトグラフィー支持体である。

【0025】

上で開示した方法のいずれかの種々の態様において、関心対象の抗体は、配列番号：1

50

の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む。

【0026】

上で開示した方法のいずれかの種々の態様において、関心対象の抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み：（a）HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；（b）HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；（c）HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；（d）HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；（e）HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および（f）HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む。

10

【0027】

上で開示した方法のいずれかの種々の態様において、関心対象の抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み：（a）HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；（b）HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；（c）HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；（d）HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；（e）HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および（f）HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む。

20

【0028】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、関心対象の抗体は配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに結合する。

【0029】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、関心対象の抗体は配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体のHVR-H2（配列番号：36）に特異的に結合する。

30

【0030】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、関心対象の抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、および抗イディオタイプ抗体は、配列番号：25または配列番号：26から選択されるアミノ酸配列内に含まれる抗HCMV抗体上のエピトープに結合する。

【0031】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、関心対象の抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体であり、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：27または配列番号：28から選択されるアミノ酸がアミノ酸配列内に含まれる抗HCMV抗体上のエピトープに結合する。

40

【0032】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、関心対象の抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：3の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体、並びに（b）配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体である。

【0033】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、関

50

心対象の抗体に結合し、試料における少なくとも1つのその他の抗HCMV抗体には結合しない。

【0034】

上で開示した方法のいずれかの種々の態様において、生物学的試料は、ヒト被験者から単離される。いくつかの態様において、ヒト被験者は、(a) 配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体；(b) 配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体；並びに(c) これらの組み合わせから選択される抗HCMV抗体で治療されている。

【0035】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、本方法は、公知のレベルと比較して関心対象の抗体のレベルを決定するために標準曲線を使用することをさらに含む。

【0036】

上で開示した方法のいずれかのいくつかの態様において、生物学的試料は、血液、血漿または血清である。いくつかの態様において、試料は、血清である。

【0037】

本発明は、キットをさらに提供する。ある態様において、本発明は、(a) 配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む第1の抗HCMV抗体；(b) 配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む第2の抗HCMV抗体；および(c) これらの組み合わせから選択される関心対象の抗体を生物学的試料中で特異的に検出するための免疫アッセイキットを提供し、キットは：(a) 捕獲試薬として、関心対象の抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を含む容器；(b) 関心対象の抗体に結合する検出可能な抗体を含む容器；および(c) 前記関心対象の抗体を検出するための説明書を含む。いくつかの態様において、キットは、関心対象の抗体を検出するためのELISA法において有用である。

【0038】

いくつかの態様において、キットは、捕獲試薬のための固体支持体をさらに含む。いくつかの態様において、捕獲試薬は、固体支持体上に固定される。いくつかの態様において、捕獲試薬は、マイクロタイタープレート上に被覆される。

【0039】

種々の態様において、抗イディオタイプ抗体は、上で開示した抗イディオタイプ抗体のいずれかの1つまたは複数である。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、(a) 配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む第1の抗イディオタイプ抗体；(b) 配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む第2の抗イディオタイプ抗体；および(c) これらの組み合わせから選択される。

【0040】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、番号：13~24からなる群より選択される少なくとも1つの重鎖超可変領域を含む抗HCMV抗体に特異的に結合する。1つのその他の態様において、抗体は、3つの重鎖超可変領域(HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3)および3つの軽鎖超可変領域(HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3)を含み：(a) HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；(b) HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；(c) HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；(d) HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；(e) HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および(f) HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む。もう一つの態様において、抗体は、3つの重鎖超可変領域(HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3)および3つの軽鎖超可変領域(HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3)を含み：(a) HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；(b) HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；(c) HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；(d) HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；(e) HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および(f) HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む。

【0041】

10

20

30

40

50

また、本発明は、本発明の抗イデオタイプHCMV抗体をコードする単離された核酸を提供する。また、本発明は、このような抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を提供する。本発明は、抗体が産生されるように、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することを含む抗体を産生する方法をさらに提供する。本方法は、宿主細胞から抗体を回収することをさらに含んでもよい。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】マウスmAb 4.25B10.15の重鎖可変領域（VH）（配列番号：5）の、マウス生殖細胞系重鎖可変ドメイン領域IGHV1-54^{*}03（配列番号：6）とのアミノ酸配列整列を示す。超可変領域（HVR）は、ボックス内である。マウス生殖細胞系配列と異なるアミノ酸残基を強調してある。

10

【図2】マウスmAb 4.25B10.15の軽鎖可変領域（VL）（配列番号：7）の、マウス生殖細胞系重鎖可変ドメイン領域IGKV5-39^{*}01（配列番号：8）とのアミノ酸配列整列を示す。アミノ酸は、Kabat番号付けに従って番号をつけてある。超可変領域（HVR）は、ボックス内である。

【図3】マウスmAb 1.9E1.1の重鎖可変領域（VH）（配列番号：9）の、マウス生殖細胞系重鎖可変ドメイン領域IGHV1-50^{*}01（配列番号：10）とのアミノ酸配列整列を示す。超可変領域（HVR）は、ボックス内である。マウス生殖細胞系配列と異なるアミノ酸残基を強調してある。

【図4】マウスmAb 1.9E1.1の軽鎖可変領域（VL）（配列番号：11）の、マウス生殖細胞系重鎖可変ドメイン領域IGLV1^{*}01（配列番号：12）とのアミノ酸配列整列を示す。アミノ酸は、Kabat番号付けに従って番号をつけてある。超可変領域（HVR）は、ボックス内である。マウス生殖細胞系配列と異なるアミノ酸残基を強調してある。

20

【図5】ビオチン抱合された抗HCMVイデオタイプ抗体（たとえば、1.9E1.1）がストレプトアビジン被覆したプレートに、および溶液中の治療的抗HCMV抗体に結合することによる抗HCMV PK ELISA形式を示す。次いで、複合体には、化学発光検出のためのHRPに抱合されたマウス抗ヒトIgG Fc 抗体が結合される。

【図6】実施例2において記述した抗HCMV PK ELISAを使用して決定したときの、抗HCMV抗体抗CIおよび抗gHに対する種々の精製した抗イデオタイプ抗体の結合活性を示す。

【図7】実施例2において記述した抗HCMV PK ELISAアッセイにおける捕獲抗体として抗イデオタイプモノクローナル抗体1.9E1.1を使用して抗HCMV抗体抗gHでスパイクした個々の血清試料の回収を示す。

30

【図8】抗HCMVイデオタイプ抗体（たとえば、4.25B10.15）が治療的抗HCMV抗体に結合するための固体支持体上に固定されることによる抗HCMV PK ELISA形式を示す。次いで、複合体には、化学発光検出のためのHRPに抱合されたマウス抗ヒトIgG Fc 抗体が結合される。

【図9】実施例3において記述した抗HCMV PK ELISAにおける捕獲抗体として抗イデオタイプモノクローナル抗体4.25B10.15または4.23F9.5を使用して抗HCMV抗体抗CIでスパイクした個々の血清試料の回収を示す。抗-CIは、プール試料および試料1~4について4 μg/mL（高）または0.5 μg/mL（低）のいずれかで；試料5について2 μg/mL（高）または0.6 μg/mL（低）のいずれかで、および試料6および7について7.62 μg/mL（高）または0.476 μg/mL（低）のいずれかでスパイクした。

40

【発明を実施するための形態】

【0043】

1. 定義

「親和性」は、分子（たとえば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（たとえば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の全体の強度をいう。別に示されない限り、本明細書に使用される、「結合親和性」は、結合パートナーのメンバー（たとえば、抗体および抗原）の間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性をいう。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に解離定数（Kd）によって表すことができる。親和

50

性は、本明細書において記述したものを含む当該技術分野において公知の共通の方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な説明的および例示的な態様を以下に記述してある。

【0044】

「抗体」という用語は、本明細書において、最も広い意味で使用され、これらが所望の抗原結合性活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（たとえば、二重特異的抗体）および抗体断片を含むが限定されない種々の抗体構造を包含する。

【0045】

「抗体断片」は、無傷の抗体が結合する抗原を結合する無傷の抗体の部分を含む無傷の抗体以外の分子をいう。抗体断片の例は、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアポディー；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（たとえば、scFv）；および抗体断片から形成される多特異的抗体を含むが、限定されない。

10

【0046】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメインまたは定常領域のタイプをいう。抗体の5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、およびこれらのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、たとえば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂にさらに分けられ得る。免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、
、
、
、
およびμと呼ばれる。

【0047】

「検出する」という用語は、標的分子の定性的および定量的測定の間方を含むように最も広い意味で使用される。一つの側面において、本明細書において記述した検出方法は、生物学的試料における関心対象の抗体の単なる存在を同定するために使用される。もう一つの側面において、本方法は、試料において関心対象の抗体が検出可能なレベルにて存在するかどうかを試験するために使用される。さらにもう一つの側面において、本方法は、試料において関心対象の抗体の量を定量化するために、およびさらに異なる試料からの抗体レベルを比較するために使用することができる。

20

【0048】

「生物学的試料」という用語は、関心対象の抗体を含み得る任意の生物学的物質をいう。試料は、赤血球、白血球、血小板、血清および血漿を含む全血または全血成分、腹水、硝子体液（*itreous fluid*）、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、唾液、痰、涙、汗、粘液、脳脊髄液および関心対象の抗体を含み得る体のその他の成分などの生物学的液体であることができる。種々の態様において、試料は、任意の動物由来の体試料である。いくつかの態様において、試料は、哺乳動物由来である。いくつかの態様において、試料は、ヒト被験者由来である。いくつかの態様において、生物学的試料は、臨床患者または治療的抗HCMV抗体もしくは抗体群で治療された患者由来である。一定の態様において、生物学的試料は、血清または血漿である。一定の態様において、生物学的試料は、臨床患者由来の血清である。

30

【0049】

「捕獲試薬」または「被覆抗体」という用語は、適切な条件下で、捕獲試薬および関心対象の抗体の複合体を試料の残りから分離することができるように、関心対象の抗体のイディオタイプを結合し、かつ生物学的試料における関心対象の抗体を結合すること、および捕獲することができる抗イディオタイプ抗体またはこのような抗体の混合物をいう。

40

【0050】

本明細書に使用される、「抗イディオタイプ抗体」は、同抗体のV_Hおよび/またはV_Lドメインに結合する抗体、この場合は関心対象の抗体である。典型的には、このような抗イディオタイプ抗体は、関心対象の抗体でマウスなどの哺乳動物を免疫すること、ハイブリドーマを産生すること、および捕獲試薬または検出可能な抗体についてであろうとなかろうとハイブリドーマに由来する抗体のパネルからアッセイにおいて最もきれいなシグナルを与えるこれらの抗体を選択することによって調製される。典型的には、捕獲試薬は、固

50

定されている、または固定可能である。このような抗イディオタイプ抗体は、モノクローナル抗体であり、およびたとえばマウスまたはラット抗体などの齧歯類抗体であることができる。

【0051】

本明細書に使用される、「抗Complex I抗体」、「抗CI抗体」または「抗CI」という用語は、配列番号：1の重鎖可変ドメインおよび配列番号：2の軽鎖可変ドメインを含む抗HCMV抗体または以下に示したとおりの少なくとも1つのHVR領域を含む抗体をいう：

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYGMNWRQAPGGLEWV
 GWINTYTGEPTYADDFKGRVTITRDTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYC
 ARSWYYVSNYWFVDVWGQGTLLVTVSS (配列番号：1)

10

【0052】

太字の下線を引いた配列は、配列番号：1のHVR-H1 (配列番号：29) HVR-H2 (配列番号：30) およびHVR-H3、(配列番号：31) に対応する。

SVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSQHSTYTIIEWYQQQPGKGPRLMK
 LKKGDSHSTGDGIPDRFSGSSGADRYLTISNLQSEDEADYYCGVGDV
 IKEQFVYVFGGGTKLTVLG (配列番号：2)

【0053】

太字の下線を引いた配列は、配列番号：2のHVR-L1 (配列番号：32)、HVR-L2 (配列番号：33) およびHVR-L3、(配列番号：34) に対応する。

【0054】

本明細書に使用される、「抗gH抗体」または「抗gH」という用語は、配列番号：3の重鎖可変ドメインおよび配列番号：4の軽鎖可変ドメインを含む抗HCMV抗体または以下に示したとおりの少なくとも1つのHVR領域を含む抗体をいう。

EEQVLESGGGLVKPGGSLRLSQAASGFTFSPYSVFWVRQAPGKGLEWV
 SSINSNSRYKYYADSVKGRFTISRDNAAENSIFLQMNSLRAEDTAVYYC
 ARDRSYAFSSGSLSDYVYGLDVGQGTLLVTVSSS (配列番号：3)

20

【0055】

太字の下線を引いた配列は、配列番号：3のHVR-H1 (配列番号：35)、HVR-H2 (配列番号：36) およびHVR-H3、(配列番号：37) に対応する。

DIVMTQSPSLSVTPGEPASISCRSSQSLLHTNGYNYLDWYVQKPGQS
 PQLLIYLASNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVETEDVGVYYCMQA
 LQIPRTFGQGTKVEIK (配列番号：4)

30

【0056】

太字の下線を引いた配列は、配列番号：4のHVR-L1 (配列番号：38)、HVR-L2 (配列番号：39) およびHVR-L3、(配列番号：40) に対応する。

【0057】

本明細書に使用される、「抗CIイディオタイプ抗体」は、配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列および配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列を有する抗CIモノクローナル抗体に、または配列番号：1の重鎖可変ドメイン配列および配列番号：2の軽鎖可変ドメイン配列 (たとえば、配列番号：29~34) を有する抗CIモノクローナル抗体の全ての6つの超可変領域を含む抗CI抗体に、抗CIの検出に十分に有用な特異性および親和性で、特異的に結合するものである。

40

【0058】

本明細書に使用される、「抗gHイディオタイプ抗体」は、配列番号：3の重鎖可変ドメイン配列および配列番号：4の軽鎖可変ドメイン配列を有する抗gHモノクローナル抗体に、または配列番号：3の重鎖可変ドメイン配列および配列番号：4の軽鎖可変ドメイン配列 (たとえば、配列番号：35~40) を有する抗gHモノクローナル抗体の全ての6つの超可変領域を含む抗gH抗体に、抗gHの検出に十分に有用な特異性および親和性で、特異的に結合するものである。

【0059】

50

「検出可能な抗体」という用語は、関心対象の抗体に結合し、かつ検出手段によって増幅される標識を介して直接的に、またはたとえば標識されているもう一つの抗体を介して間接的に、いずれかで検出することができる抗体をいう。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、ヒト抗体に結合する非ヒト種由来の抗体である。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、関心対象の抗体のイディオタイプを結合するこのような抗体の抗イディオタイプ抗体または混合物である。直接の標識化のためには、抗体は、典型的にはいくつかの手段によって検出可能である部分に抱合される。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼに抱合される。

【0060】

「検出手段」という用語は、本明細書におけるアッセイにおいてシグナルを伝え、次いでこれが読み出されることを介して検出可能な抗体の存在を検出するために使用される部分または技術をいう。これは、マイクロタイタープレート上に捕獲された標識などの固定化された標識を増幅する試薬を含む。

10

【0061】

本明細書において、「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。本用語は、天然配列Fc領域および変異体Fc領域を含む。一つの態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から重鎖のカルボキシル末端まで伸びる。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在してもよく、またはしなくてもよい。本明細書において特定されない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているように、EUインデックスとも呼ばれる、EU番号付け系に従う。

20

【0062】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基をいう。可変ドメインのFRは、一般に4つのFRドメイン:FR1、FR2、FR3およびFR4から成る。したがって、HVRおよびFR配列は、一般にVH(またはVL)において以下の配列で現れる:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0063】

「全長抗体」、「無傷の抗体」および「全抗体」という用語は、天然の抗体構造に実質的に類似の構造を有する、または本明細書で定義したようなFc領域を含む重鎖を有する抗体をいうために、交換可能に本明細書に使用される。

30

【0064】

「宿主細胞」、「宿主株化細胞」および「宿主細胞培養」という用語は、交換可能に使用され、および外因性核酸が導入された細胞をいい、このような細胞の子孫を含む。宿主細胞は、「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これは初代形質転換細胞および継代の数に関係なくこれに由来する子孫を含む。子孫は、核酸含量が親細胞と完全に同一でなくてもよいが、突然変異を含んでいてもよい。元の形質転換された細胞においてスクリーニングされ、または選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異体子孫が、本明細書に含まれる。

40

【0065】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生され、またはヒト抗体レパートリーもしくはその他のヒト抗体をコードする配列を利用する非ヒト供与源に由来する抗体のものに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、特に、非ヒト抗原結合性残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0066】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択の際に最も共通して存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループ由来である。一般に、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of I

50

mmunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3におけるようなサブグループである。一つの態様において、VLについては、サブグループは、上記、Kabat et al.におけるようなサブグループカッパIである。一つの態様において、VHについては、サブグループは、上記、Kabat et al.におけるようなサブグループIIIである。

【0067】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体をいう。一定の態様において、ヒト化抗体は、実質的に少なくとも1つ、および典型的には2つの可変ドメインの全てを含むだろうし、HVR（たとえば、CDR）の全てまたは実質的に全ては、非ヒト抗体のものに対応し、およびFRの全てまたは実質的に全ては、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意にヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでいてもよい。抗体、たとえば非ヒト抗体の「ヒト化された形態」は、ヒト化を受けた抗体をいう。

10

【0068】

本明細書に使用される、「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が超可変である、および/または構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの各々の領域をいう。一般に、天然の4鎖抗体は、6つのHVR；VH（H1、H2、H3）の3つおよびVL（L1、L2、L3）の3つを含む。HVRは、一般に超可変ループからの、および/または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、後者は最も高い配列可変性があり、および/または抗原認識に参与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）および96～101（H3）にて生じる。（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3）は、L1の24～34、L2の50～56、L3の89～97、H1の31～35B、H2の50～65およびH3の95～102アミノ酸残基に存在する。（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは、一般に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。また、CDRは、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」または「SDR」を含む。SDRは、CDRの領域内に含まれ、省略CDRまたはa-CDRと呼ばれる。例示的なa-CDR（a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3）は、L1の31～34、L2の50～55、L3の89～96、H1の31～35B、H2の50～58およびH3の95～102アミノ酸残基に存在する。（Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照されたい）。特に明記しない限り、可変ドメイン（たとえば、FR残基）におけるHVR残基およびその他の残基は、本明細書において、上記、Kabat et al.に従って番号付けしてある。

20

30

【0069】

「個体」または「被験体」は、哺乳動物である。哺乳動物は、家畜化された動物（たとえば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌおよびウマ）、霊長類（たとえば、ヒトおよびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギおよび齧歯類（たとえば、マウスおよびラット）を含むが、限定されない。一定の態様において、個体または被験体は、ヒトである。

【0070】

本明細書に使用される「乳児」は、出生から約1年を越えないまでの年齢の範囲の個体または被験体をいい、および0～約12ヶ月の乳児を含む。

40

【0071】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様において、抗体は、たとえば電気泳動的（たとえば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）、またはクロマトグラフィー（たとえば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定される、95%または99%を上回る純度に精製される。抗体純度の評価のための方法の総説については、たとえばFlatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照されたい。

【0072】

50

「単離された」核酸は、その天然環境の成分から分離された核酸分子をいう。単離された核酸は、通常核酸分子を含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、核酸分子は、染色体外に、またはその天然の染色体位置と異なる染色体位置に存在する。

【0073】

「抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸」は、単一のベクターまたは別々のベクターにおけるこのような核酸分子（群）および宿主細胞において1つまたは複数の位置に存在するこのような核酸分子（群）を含む抗体重鎖および軽鎖（またはその断片）をコードする1つまたは複数の核酸分子をいう。

【0074】

本明細書に使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体をいい、すなわち、集団を成す個々の抗体は、同一であり、および/または生じ得る変異体抗体を除いて、たとえば天然に存在する突然変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製の産生の際に生じる同じエピトープに結合し、このような変異体は、一般に少量で存在する。ポリクローナル抗体調製とは対照的に、これは、典型的には異なる決定因子（エピトープ）に対して作られた異なる抗体を含み、モノクローナル抗体標品の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定因子に対して作られる。したがって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の特徴が、抗体の実質的に均一な集団から得られるものであることを示し、および任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されない。たとえば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージ-ディスプレイ法およびヒト免疫グロブリン座位の全部または一部を含むトランスジェニック動物を利用する方法を含むが限定されない、多様な技術によって作製してもよく、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法およびその他の例示的な方法は、本明細書に記述されている。

【0075】

「ネイキッド抗体」は、異種部分（たとえば、細胞毒性部分）または放射標識に抱合されていない抗体をいう。ネイキッド抗体は、医薬品製剤に存在してもよい。

【0076】

「天然の抗体」は、種々の構造をもつ天然に存在する免疫グロブリン分子をいう。たとえば、天然のIgG抗体は、ジスルフィド結合された2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖で構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端基からC末端まで、各重鎖は、また可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて3つの定常ドメイン（CH1、CH2およびCH3）を有する。同様に、N末端基からC末端まで、各軽鎖は、また可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて定常軽（CL）ドメインを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2つのタイプの一方に分けられ得る。

【0077】

「パッケージ挿入物」という用語は、適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、このような治療的製品の使用に関する禁忌および/または警告に関する情報を含む治療的製品の商業パッケージにおいて慣習的に含まれる説明書をいうために使用される。

【0078】

「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、参照ポリペプチド配列に関して、配列を整列させて、必要に応じて、最大パーセント配列同一性を達成するためにギャップを導入した後に、および配列同一性の一部として任意の保存的置換を考慮することなく、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のための整列は、当該技術分野における技術の範囲内である種々の方法で、たとえば公的に公開されているBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどのコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるために

10

20

30

40

50

適切なパラメーターを決定することができる。しかし、本明細書における目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成してある。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Incによって開発され、およびソースコードは、米国著作権局、Washington DC, 20559における使用者ドキュメンテーションと共に出版されており、これは、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録される。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc, South San Francisco, Californiaから公的に公開されており、またはソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V40Dを含むUNIXオペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるはずである。全ての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定され、および変動するわけではない。

10

【0079】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較のために使用される状況において、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bに対する、との、またはに対する%アミノ酸配列同一性（代わりに、所与のアミノ酸配列Bに対する、との、もしくははに対して一定の%アミノ酸配列同一性を有する、または含む所与のアミノ酸配列Aと言い表すことができる）は、以下の通りに算出される：

100倍の分数 X/Y

式中Xは、配列整列プログラムALIGN-2によって、そのプログラムのAおよびBの整列において同一のマッチとして記録されるアミノ酸残基の数であり、およびYは、Bにおけるアミノ酸残基の合計数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと同じでない場合、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性は、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性と等しくないだろうことが理解される。別途具体的に明示されない限り、本明細書に使用される全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して直前のパラグラフに記載されているとおりに得られる。

20

【0080】

抗HCMV抗体の「サインペプチド」は、1つの抗体アイソタイプにだけ存在するタンパク質分解ペプチド（たとえば、トリプシンペプチド）をいう。たとえば、抗CIサインペプチドは、配列番号：1の重鎖可変ドメインおよび配列番号：2の軽鎖可変ドメインを含む抗HCMV抗体にだけ存在するトリプシンペプチドでもよい。さらなる例において、抗gHサインペプチドは、配列番号：3の重鎖可変ドメインおよび配列番号：4の軽鎖可変ドメインを含む抗体抗HCMV抗体にだけ存在するトリプシンペプチドでもよい。

30

【0081】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインをいう。天然の抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、VHおよびVL）は、一般に類似の構造を有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（HVR）を含む（たとえば、Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい）。単一のVHまたはVLドメインでも、抗原結合特異性を与えるために十分であろう。さらにまた、特定の抗原に結合する抗体は、それぞれ相補的なVLまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングするための、抗原に結合する抗体からのVHまたはVLドメインを使用して単離され得る。たとえば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)を参照されたい。

40

【0082】

本明細書に使用される、「ベクター」という用語は、それが連結されるもう一つの核酸を増殖することができる核酸分子をいう。本用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクターを含む。一定のベクターは、これらが機能的に連結されている核酸の発現を指揮することができる。このようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と称される。

【0083】

II. 組成物および方法

50

一つの側面において、本発明は、ヒト化抗HCMVモノクローナル抗体抗CIおよび抗gHに特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。一定の態様において、抗CIに結合する抗イディオタイプ抗体が提供される。一定の態様において、抗gHに結合する抗体が提供される。本発明の抗体は、たとえば、生物学的試料における、たとえば臨床的試料における抗CIおよび抗gHの検出および/または定量化のために有用である。

【0084】

A. 例示的な抗イディオタイプ抗体

一つの側面において、本発明は、抗CIおよび抗gHの検出に有用であるほど十分な特異性および親和性で抗HCMV抗体抗CIまたは抗gHに結合する単離された抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0085】

一定の態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に結合する。一定の態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体からの全ての6HVRを含む抗HCMV抗体に結合する。一定の態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体に結合する。一定の態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体からの全ての6HVRを含む抗HCMV抗体に結合する。

【0086】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み：

- (a) HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；
- (b) HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；
- (c) HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；
- (d) HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；
- (e) HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および
- (f) HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む。

【0087】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む。

【0088】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含み：

- (a) HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；
- (b) HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；
- (c) HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；
- (d) HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；
- (e) HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および
- (f) HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む。

【0089】

いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む。

【0090】

もう一つの側面において、抗CIイディオタイプ抗体は、配列番号：5のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（VH）配列を含む。一定の態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比して置換（たとえば、保存的置換）、挿入または欠失を含むが、その配列を含む

10

20

30

40

50

抗CIイデオタイプ抗体は、抗CIに結合するための能力を保持する。一定の態様において、1~10アミノ酸の総数が、配列番号：5において置換され、挿入され、および/または欠失される。一定の態様において、置換、挿入または欠失は、HVRの外側の領域で（すなわち、FRにおいて）生じる。任意に、抗CIイデオタイプ抗体は、配列番号：5のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の態様において、VHは、（a）配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2および（c）配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

【0091】

もう一つの側面において、抗CIイデオタイプ抗体であって、抗体が配列番号：7のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、抗体が提供される。一定の態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に比して置換（たとえば、保存的置換）、挿入または欠失を含むが、その配列を含む抗CIイデオタイプ抗体は、抗CIに結合するための能力を保持する。一定の態様において、1~10アミノ酸の総数が、配列番号：7において置換され、挿入され、および/または欠失される。一定の態様において、置換、挿入または欠失は、HVRの外側の領域で（すなわち、FRにおいて）生じる。任意に、抗CIイデオタイプ抗体は、配列番号：7のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の態様において、VLは、（a）配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-L1；（b）配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-L2；および（c）配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

【0092】

もう一つの側面において、抗CIイデオタイプ抗体であって、抗体が上で提供される態様のいずれかのようなVHおよび上で提供される態様のいずれかのようなVLを含む、抗体が提供される。一つの態様において、抗体は、それぞれ配列番号：5および配列番号：7においてVHおよびVL配列を含み、これらの配列の翻訳後修飾を含む。

【0093】

もう一つの側面において、抗gHIデオタイプ抗体は、配列番号：9のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（VH）配列を含む。一定の態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性にて有するVH配列は、参照配列に比して置換（たとえば、保存的置換）、挿入または欠失を含むが、その配列を含む抗gHIデオタイプ抗体は、抗gHIに結合するための能力を保持する。一定の態様において、1~10アミノ酸の総数が、配列番号：9において置換され、挿入され、および/または欠失される。一定の態様において、置換、挿入または欠失は、HVRの外側の領域で（すなわち、FRにおいて）生じる。任意に、抗gHIデオタイプ抗体は、配列番号：9のVH配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の態様において、VHは、（a）配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H2および（c）配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

【0094】

もう一つの側面において、抗gHIデオタイプ抗体であって、抗体が配列番号：11のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、抗体が提供される。一定の態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に比して置換（たとえば、保存的置換）、挿入または欠失を含むが、その配列を含む抗gHIデオタイプ抗体は、抗gHIに結合するための能力を保持する。一定の態様において、1~10アミノ酸の総数が配列番号：11において置換され、挿入され、および/または欠失される。一定の態様において、置換、挿入または欠失は、

HVRの外側の領域で(すなわち、FRにおいて)生じる。任意に、抗gHイディオタイプ抗体は、配列番号：11のVL配列を含み、その配列の翻訳後修飾を含む。特定の態様において、VLは、(a)配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-L2；および(c)配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される1つ、2つまたは3つのHVRを含む。

【0095】

もう一つの側面において、抗gHイディオタイプ抗体であって、抗体は、上で提供される態様のいずれかのようなVHおよび上で提供される態様のいずれかのようなVLを含む、抗体が提供される。一つの態様において、抗体は、それぞれ配列番号：9および配列番号：11のVHおよびVL配列を含み、これらの配列の翻訳後修飾を含む。

10

【0096】

さらなる側面において、本発明は、本明細書に提供される抗HCMVイディオタイプ抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。たとえば、一定の態様において、配列番号：5のVH配列および配列番号：7のVL配列を含む抗CIイディオタイプ抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。一定の態様において、配列番号：9のVH配列および配列番号：11のVL配列を含む抗gHイディオタイプ抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。一定の態様において、配列番号：1の重鎖配列および配列番号：2の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに特異的に結合する抗体が提供される。一定の態様において、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体の少なくとも1つのHVRに特異的に結合する抗体が提供される。一定の態様において、配列番号：3の重鎖配列および配列番号：4の軽鎖配列を含む抗HCMV抗体のHVR-H2(配列番号：36)に特異的に結合する抗体が提供される。一定の態様において、配列番号：25、配列番号：26、配列番号：27および配列番号：28から選択されるアミノ酸アミノ酸配列内に含まれるエピトープに結合する抗体が提供される。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：25または配列番号：26から選択されるアミノ酸アミノ酸配列内に含まれるエピトープに結合する。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：27または配列番号：28から選択されるアミノ酸アミノ酸配列内に含まれるエピトープに結合する。

20

【0097】

本発明のさらなる側面において、上記態様のいずれかに従った抗HCMVイディオタイプ抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一つの態様において、抗HCMVイディオタイプ抗体は、抗体断片、たとえば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディーまたはF(ab')₂断片である。もう一つの態様において、抗体は、全長抗体、たとえば本明細書で定義したような無傷のIgG1抗体またはその他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

30

【0098】

A. 抗体産生

本発明に従って使用される抗イディオタイプ抗体の産生のための例示的な技術に関して記述を行う。

【0099】

1. ポリクローナル抗体

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含んでいてもよい。ポリクローナル抗体を調製する方法は、当業者に公知である。たとえば、ポリクローナル抗体を免疫化薬および必要に応じてアジュバントの1または複数回の注射によって哺乳動物において産生することができる。典型的には、免疫化薬および/またはアジュバントを頻回皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注射する。免疫化薬は、抗CI、抗gH、その抗原結合断片またはその融合タンパク質を含んでいてもよい。免疫される哺乳動物において免疫原性であることが公知のタンパク質に免疫化薬を抱合することは、有用であろう。このような免疫原性タンパク質の例は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリンおよび大豆トリプシン阻害剤を含むが、限定されない。使用してもよいアジュバントの例

40

50

は、完全フロイントアジュバントおよびMPL-TDMアジュバント（モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコラート）を含む。免疫化プロトコルは、過度の実験を伴わずに当業者によって選択され得る。次いで、哺乳動物から血を採り、および血清を抗イデオタイプ抗体価について分析することができる。必要に応じて、哺乳動物を抗体価が増大する、またはプラトーになるまで追加免疫することができる。

【0100】

2. モノクローナル抗体

あるいは、本発明の抗体は、モノクローナル抗体でもよい。モノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)によって最初に記述されたハイブリドーマ法を使用して作製してもよく、または組換えDNA法（たとえば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）によって作製してもよい。

10

【0101】

ハイブリドーマ法において、免疫化のために使用したタンパク質に特異的に結合するであろう抗体を産生する、または産生することができるリンパ球を誘発するため、上記の通りに、マウスまたはハムスターなどのその他の適切な宿主動物を免疫する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫してもよい。免疫化後、リンパ球を単離し、およびハイブリドーマ細胞を形成するため、ポリエチレングリコールなどの適切な融剤を使用して、次いで骨髓腫株化細胞と融合する（Goding, Monoclonal Antibodies: PrinciplesおよびPractice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）。

20

【0102】

こうして調製されたハイブリドーマ細胞を、非融合の、親骨髓腫細胞（また融合パートナーとも呼ばれる）の増殖または生存を阻害する1つまたは複数の物質を含む適切な培地に接種し、および増殖させる。たとえば、親骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRTまたはHPRT）を欠いている場合、ハイブリドーマのための選択培地は、典型的にはHGPRT欠失細胞の成長を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含むだろう（HAT培地）。

【0103】

融合パートナー骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定な高レベル抗体産生を補助するものであり、および非融合の親細胞に対して選択する選択培地に感受性である。骨髓腫株化細胞は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手できるMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍に由来したもの、およびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USAから入手できるX63-Ag8-653細胞などのSP-2および誘導体などのネズミ骨髓腫株である。また、ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞は、ヒトモノクローナル抗体の産生について記述されている（Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984);およびBrodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。

30

【0104】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地を、抗原に対して作られたモノクローナル抗体産生についてアッセイする。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）法などのインビトロでの結合アッセイによって決定してもよい。たとえば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)において記述されたスキヤッチャード解析によって決定することができる。

40

【0105】

一旦所望の特異性、親和性および/または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されると、クローンを限界希釈手順によってサブクローニングし、および標準的な方法（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)）によって増殖させてもよい。たとえば、この目的のための適切な培地は、

50

D-MEMまたはRPMI-1640培地を含む。加えて、ハイブリドーマ細胞を、たとえばマウスへの細胞のip注射によって動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させてもよい。

【0106】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、たとえばアフィニティークロマトグラフィー（たとえば、プロテインAまたはプロテインG-セファロースを使用する）またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、その他などの従来の抗体精製手順によって培地、腹水液または血清から適切に分離される。

【0107】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順（たとえば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）を使用して容易に単離され、および配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの供与源としての役割を果たす。一旦単離されると、DNAを発現ベクターに配置してもよく、次いでこれを、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を成し遂げるために、大腸菌（*E. coli*）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または抗体タンパク質を別途産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞に、トランスフェクトする。抗体をコードするDNAの細菌における組換え発現についての総説は、Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993)およびPluckthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992)を含む。

【0108】

さらなる態様において、モノクローナル抗体または抗体断片を、McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990)において記述された技術を使用して生成される抗体ファージライブラリーから単離することができる。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991)およびMarks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)は、それぞれファージライブラリーを使用するマウスおよびヒト抗体の単離について記述する。その後の刊行物は、鎖シャッフリングによる高親和性（nM範囲）ヒト抗体の産生（Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)）、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための戦略としてのコンビナトリアル感染およびインビボ組換え（Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.* 21:2265-2266 (1993)）について記述する。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替である。

【0109】

原則として、ファージコートタンパク質に融合した種々の抗体可変領域の断片（Fv）をディスプレイするファージを含むファージライブラリーをスクリーニングすることによって、合成抗体クローンを選択する。このようなファージライブラリーを所望の抗原に対してスクリーニングする。所望の抗原に結合できるFv断片を発現するクローンを抗原に吸着させ、およびしたがって、ライブラリーにおける非結合クローンから分離する。次いで、結合クローンを抗原から溶出し、および抗原吸着/溶出のさらなるサイクルによって、さらに濃縮することができる。

【0110】

可変ドメインは、Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)に記載されたように、VHおよびVLが短い、柔軟なペプチドを介して共有結合で連結された単鎖Fv（scFv）断片として、またはこれらが定常ドメインにそれぞれ融合され、および非共有結合で相互作用するFab断片として、いずれかでファージ上に機能的にディスプレイすることができる。

【0111】

VHおよびVL遺伝子のレパートリーは、Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994)に記載されたように、別々にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってクローン化し、およびファージライブラリーにおいてランダムに組換えることができ、次いでこれにより抗原結合性クローンを探索することができる。免疫された供与源からのライブラリー

10

20

30

40

50

は、ハイブリドーマ構築の要求なしで、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993)によって記述されたように、ナイーブライブラリーをクローン化して、任意の免疫化なしに、ヒト抗体の単一供与源を広範囲の非自己抗原におよび自己抗原にも提供することができる。最後に、ナイーブライブラリーは、また、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)によって記述されたように、幹細胞からの再構成されないV遺伝子セグメントをクローン化すること、並びに高可変性のCDR3領域をコードするように、およびインビトロでの再構成を達成するようにランダムな配列を含むPCRプライマーを使用することによって、合成的に作製することができる。

【0112】

ライブラリーのスクリーニングは、当該技術分野において公知の種々の技術によって達成することができる。たとえば、抗CIまたは抗gHは、吸着プレートのウェルを被覆するか、吸着プレートに付着され、もしくは細胞ソーティングに使用される宿主細胞上で発現するか、またはストレプトアビジン被覆したビーズでの捕獲のためにビオチン抱合するために使用すること、またはディスプレイライブラリーをパニングするための任意のその他の方法において使用することができる。

【0113】

遅い解離動態（および優れた結合親和性）をもつ抗体の選択は、Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990)に、およびWO 92/09690に記載されたように長期洗浄および一価のファージディスプレイ、並びにMarks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992)に記載されたように低被覆密度の抗原の使用によって促進することができる。

【0114】

本発明の抗イディオタイプ抗体のいずれも、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3において記述された、関心対象のファージクローンを選択するための適切な抗原スクリーニング手順、続く関心対象の、および適切な定常領域（Fc）配列のファージクローンからのFv配列を使用する全長抗イディオタイプ抗体クローンの構築をデザインすることによって得ることができる。

【0115】

3. 抗体変異体

一定の態様において、本明細書に提供した抗体のアミノ酸配列変異体が想定される。たとえば、抗体の結合親和性および/またはその他の生物学的特性を改善することが望ましいであろう。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切な修飾を抗体をコードするヌクレオチド配列に導入することによって、またはペプチド合成によって調製してもよい。このような修飾は、たとえば抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失および/または挿入、および/または置換を含む。欠失、挿入および置換の任意の組み合わせを、最終的な構築物に到達するために行うことができるが、ただし最終構築物は、所望の特徴、たとえば抗原結合性を有することを条件とする。

【0116】

a) 置換、挿入、および欠失変異体

一定の態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体を提供する。置換突然変異誘発のための関心対象の部位は、HVRおよびFRを含む。保存的置換を「保存的置換」の見出しで表1に示してある。より実質的な変化を、表1において「例示的な置換」の見出しで、およびさらにアミノ酸側鎖クラスに関して後述したように提供してある。アミノ酸置換を、関心対象の抗体および所望の活性、たとえば保持された/改善された抗原結合、減少された免疫原性または改善されたADCCもしくはCDCについてスクリーニングした産物に導入してもよい。

【0117】

10

20

30

40

【表 1】

オリジナル残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

【0118】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従って分類され得る：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0119】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーをもう1つのクラスに交換することを伴うだろう。

【0120】

置換変異体の1つのタイプは、親抗体（たとえば、ヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる研究のために選択された生じる変異体（群）は、親抗体を基準として一定の生物学的特性（たとえば、増加した親和性、減少した免疫原性）における修飾（たとえば、改善）を有するだろうし、および/または親抗体の一定の生物学的特性を実質的に保持しただろう。例示的な置換変異体は、

親和性成熟した抗体であり、これは、たとえば本明細書において記述したファージディスプレイに基づいた親和性成熟技術を使用して都合よく生成し得る。簡潔には、1つまたは複数のHVR残基を変異させ、および変異体抗体をファージ上にディスプレイさせ、および特定の生物学的活性（たとえば、結合親和性）についてスクリーニングする。

【0121】

変化（たとえば、置換）は、たとえば抗体親和性を改善するために、HVRにおいて行ってもよい。このような変化は、HVR「ホットスポット」、すなわち体細胞の成熟過程の間に高頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基（たとえば、Chowdhury、Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照されたい）および/またはSDR（a-CDR）において行ってもよく、生じた変異体VHまたはVLを結合親和性について試験する。二次ライブラリーから構築すること、および再選択することによる親和性成熟は、たとえばHoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)において記述されている。親和性成熟のいくつかの態様において、さまざまな方法のいずれか（たとえば、エラープロードPCR、鎖シャッフリングまたはオリゴヌクレオチド定方向突然変異誘発）による成熟のために選択した可変遺伝子内に多様性を導入する。次いで、二次ライブラリーを作製する。次いで、ライブラリーをスクリーニングして所望の親和性をもつ任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するためのもう一つの方法は、いくつかのHVR残基（たとえば、一度に4~6残基）がランダム化されるHVR定方向アプローチを含む。抗原結合に關与するHVR残基は、たとえばアラニンスクランニング突然変異誘発またはモデリングを使用して具体的に同定してもよい。特に、CDR-H3およびCDR-L3がターゲットされることが多い。

10

20

【0122】

一定の態様において、置換、挿入または欠失は、このような変化が、抗体が抗原を結合する能力を実質的に減少させない限り、1つまたは複数のHVR内で生じてもよい。たとえば、結合親和性を実質的に減少させない保存的变化（たとえば、本明細書において提供した保存的置換）をHVRにおいて行ってもよい。このような変化は、HVR「ホットスポット」またはSDRの外側にあってもよい。上で提供した変異体VHおよびVL配列の一定の態様において、それぞれのHVRのいずれかは、変化がなく、または1、2または3つを超えないアミノ酸置換を含む。

【0123】

突然変異誘発のためにターゲットされ得る抗体の残基または領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085によって記述された「アラニンスクランニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基またはターゲット残基のグループ（たとえば、arg、asp、his、lysおよびgluなどの荷電残基）を同定して、中性または負に荷電したアミノ酸（たとえば、アラニンまたはポリアラニン）によって置換し、抗原と抗体の相互作用が影響を受けるかどうか決定する。さらなる置換を、最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入してもよい。あるいは、またはさらに、抗体と抗原との間の接触点を同定するための抗原抗体複合体の結晶構造。このような接触残基および隣接残基は、置換のための候補としてターゲットしても、または除去してもよい。変異体を、これらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングしてもよい。

30

40

【0124】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの長さにつながるアミノ末端および/またはカルボキシル末端融合、並びに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を伴う抗体を含む。抗体分子のその他の挿入変異体は、酵素に対する（たとえば、ADEPTに対する）抗体または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドのN末端またはC末端への融合を含む。

【0125】

B. 組換え方法および組成物

抗体は、たとえば米国特許第4,816,567号に記載されたように、組換え方法および組成

50

物を使用して産生してもよい。一つの態様において、本明細書において記述した抗イデオタイプ抗体をコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および/またはVHを含むアミノ酸配列（たとえば、抗体の軽および/または重鎖）をコードしてもよい。さらなる態様において、このような核酸を含む1つまたは複数のベクター（たとえば、発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。一つのこのような態様において、宿主細胞（たとえば、形質転換された）は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクターまたは（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクターおよび抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む。一つの態様において、宿主細胞は、真核生物の、たとえばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ球様細胞（たとえば、Y0、N50、Sp20細胞）である。一つの態様において、抗Complex I抗体または抗gH抗体を作製する方法であって、上で提供したように、抗体の発現のために適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、および任意に宿主細胞（または宿主細胞培地）から抗体を回収することを含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0126】

抗Complex I抗体または抗gH抗体の組換え産生のためには、抗体をコードする核酸を、たとえば上記の通りに単離して、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のための1つまたは複数のベクターに挿入する。従来の手順を使用して（たとえば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）、このような核酸を容易に単離し、および配列決定し得る。

【0127】

クローニングまたは抗体コードするベクターの発現のための適切な宿主細胞は、本明細書において記述した原核生物または真核生物細胞を含む。たとえば、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が不要でないときは、抗体を細菌において産生してもよい。細菌における抗体断片およびポリペプチドの発現については、たとえば米国特許第5,648,237号、第5,789,199号および第5,840,523号を参照されたい。（また、大腸菌における抗体断片の発現について記述するCharlton、Methods in Molecular Biology、Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003)、pp. 245-254を参照されたい）。発現後、抗体を可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離してもよく、およびさらに精製することができる。

【0128】

原核生物に加えて、真菌または酵母などの真核生物微生物は、抗体コードするベクターのための適切なクローニングまたは発現宿主であり、部分的にまたは完全にヒトのグリコシル化パターンをもつ抗体の産生を生じる、グリコシル化経路が「ヒト化された」真菌および酵母株を含む。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)およびLi et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照されたい。

【0129】

また、グリコシル化された抗体の発現のための適切な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物および昆虫細胞を含む。多数のパキウウイルスの株が同定されており、これらは、特にヨトウガ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用してもよい。

【0130】

また、植物細胞培養を宿主として利用することができる。たとえば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号および第6,417,429号（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術について記述する）を参照されたい。

【0131】

また、脊椎動物細胞を宿主として使用してもよい。たとえば、懸濁液において増殖するように適応された哺乳動物株化細胞は、有用であろう。有用な哺乳動物宿主株化細胞のその他の例は、SV40 (COS-7) によって形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胚性腎臓株（たとえば、Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)において記述された293または293細胞；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)；マウスセルトリ細胞（たとえば、Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)において記述されたTM4細胞；サル腎臓細胞 (CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA)；イヌ腎臓細胞 (MDCK)；パッファローラット肝細胞 (BRL 3A)；ヒト肺細胞 (W138)；ヒト肝細胞 (Hep G2)；マウス乳房腫瘍 (MMT 060562)；たとえば、Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)において記述されたTRI細胞；MRC 5細胞；およびFS4細胞である。その他の有用な哺乳動物宿主株化細胞は、DHFR- CHO細胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)) を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、およびY0、NS0およびSp2/0などの骨髓腫株化細胞を含む。抗体産生のための適切な一定の哺乳動物宿主株化細胞の総説については、たとえば、Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照されたい。

10

【0132】

C. アッセイ

本明細書において提供した抗HCMVイディオタイプ抗体は、当該技術分野において公知の種々のアッセイによって、これらの物理的/化学的特性および/または生物学的活性について同定し、スクリーニングし、または特徴づけられ得る。

20

【0133】

1. 結合アッセイおよびその他のアッセイ

一つの側面において、本発明の抗体を、たとえばELISA、ウェスタンブロットなどの公知の方法によってその抗原結合活性について試験する。

【0134】

もう一つの側面において、競合アッセイを、本明細書において記述した抗HCMVイディオタイプ抗体と抗HCMV抗体との結合と競合する抗体を同定するために使用してもよい。

【0135】

一定の態様において、このような競合する抗体は、抗CIの同じエピトープ（たとえば、直線状または高次構造状のエピトープ）に結合する。一定の態様において、このような競合する抗体は、抗gHの同じエピトープ（たとえば、直線状または高次構造状のエピトープ）に結合する。

30

【0136】

抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)において提供される。

【0137】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化された抗HCMV抗体を、それぞれ抗HCMV抗体に結合する第1の標識抗体および抗HCMV抗体に対する結合について第1の抗体と競合するその能力について試験される第2の標識されていない抗体を含む溶液中でインキュベートする。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清に存在してもよい。対照として、固定化された抗HCMV抗体を第2の標識されていない抗体ではなく第1の標識抗体を含む溶液中でインキュベートする。抗HCMV抗体に対する第1の抗体の結合のための許容条件下でインキュベーションの後、過剰な結合していない抗体を除去して、固定化された抗HCMV抗体と会合する標識の量を測定する。固定化された抗HCMV抗体と会合する標識の量が、対照試料に相対的に試験試料において実質的に減少する場合、第2の抗体は、抗HCMV抗体に対する結合について第1の抗体と競合することを示す。HarlowおよびLane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。

40

【0138】

50

また、競合アッセイは、抗HCMV抗体をトランスフェクトして、および細胞表面上に発現した細胞を使用して、FACSで上記のような様式で行うことができる。加えて、抗HCMV抗体でのELISAは、また競合アッセイにおいて使用することができる。

【0139】

D. 検出のための方法および組成物

一定の態様において、本明細書において提供したような、抗イディオタイプ抗体のいずれか、またはこのような抗体を含む組成物は、生物学的試料における抗HCMV抗体抗CIまたは抗gHの存在を検出するために有用である。本明細書で使用される、「検出する」という用語は、定量的または定性的な検出を包含する。一定の態様において、生物学的試料は、赤血球、白血球、血小板、血清および血漿を含む全血または全血成分、腹水、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、唾液、痰、涙、汗、粘液、脳脊髄液および関心対象の抗体を含み得る体のその他の成分などの生物学的液体である。種々の態様において、試料は、任意の動物由来の体試料である。いくつかの態様において、試料は、哺乳動物由来である。いくつかの態様において、試料は、たとえば臨床試料におけるヒト化抗体などの抗体を測定するときは、ヒト被験者からである。いくつかの態様において、生物学的試料は、臨床患者または治療的抗HCMV抗体（たとえば、抗CIおよび/または抗gH）で治療された患者由来である。一定の態様において、生物学的試料は、血清または血漿である。一定の態様において、生物学的試料は、臨床患者由来の血清である。

10

【0140】

一定の態様において、標識抗HCMVイディオタイプ抗体を含む組成物が提供される。標識は、直接検出される標識または部分（蛍光、色素体、高電子密度、化学発光および放射性標識など）、並びに酵素またはリガンドなどの、たとえば酵素反応または分子間相互作用を介して間接的に検出される部分を含むが、限定されない。例示的な標識は、放射性同位元素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、および ^{131}I 、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体などの蛍光団、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ（luciferases）、たとえばホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、たとえば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼ、HRP、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合されたもの、ビオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージ標識、安定な遊離基等を含むが、限定されない。

20

30

【0141】

1. ELISA

いくつかの態様において、抗HCMVイディオタイプ抗体は、ELISAアッセイにおいて使用される。本明細書において記述したアッセイは、関心対象の抗体のための捕獲試薬として抗HCMVイディオタイプ抗体を利用するELISAである。アッセイの第1の工程において、関心対象の抗体を含むと思われる、または含む生物学的試料を捕獲（または被覆）抗体と接触し、およびインキュベートし、その結果、捕獲抗体は、関心対象の抗体を捕獲または結合し、その結果これを検出工程において検出することができる。検出工程は、関心対象の結合した抗体のいずれかと接触したときに、存在する場合に関心対象の抗体に結合する検出可能な抗体の使用を含む。検出手段を使用して、抗体上の標識およびそれ故に存在する関心対象の抗体の存在または量を検出する。

40

【0142】

一定の態様において、アッセイは、以下の工程を利用する。

【0143】

第1の工程

本明細書におけるアッセイの第1の工程において、本明細書で定義したとおりの関心対

50

象の抗体を含むと思われる、または含む生物学的試料を、関心対象の抗体に対して作られた抗イディオタイプ抗体である固定化された捕獲（または被覆）試薬と接触し、およびインキュベートする。いくつかの態様において、これらの抗体は、モノクローナル抗体であり、および任意の種由来であってもよい。いくつかの態様において、抗体は、齧歯類抗体であり、さらなる態様においてマウスまたはラットおよびさらなる態様においてマウス抗体である。

【0144】

種々の態様において、抗イディオタイプは、本明細書において開示した任意の抗イディオタイプ抗体である。一定の態様において、抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含む抗体である：（a）HVR-H1は、配列番号：13のアミノ酸配列を含み；（b）HVR-H2は、配列番号：14のアミノ酸配列を含み；（c）HVR-H3は、配列番号：15のアミノ酸配列を含み；（d）HVR-L1は、配列番号：16のアミノ酸配列を含み；（e）HVR-L2は、配列番号：17のアミノ酸配列を含み；および（f）HVR-L3は、配列番号：18のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む。一定の態様において、抗イディオタイプ抗体は、3つの重鎖超可変領域（HVR-H1、HVR-H2およびHVR-H3）および3つの軽鎖超可変領域（HVR-L1、HVR-L2およびHVR-L3）を含む：（a）HVR-H1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含み；（b）HVR-H2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含み；（c）HVR-H3は、配列番号：21のアミノ酸配列を含み；（d）HVR-L1は、配列番号：22のアミノ酸配列を含み；（e）HVR-L2は、配列番号：23のアミノ酸配列を含み；および（f）HVR-L3は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む。

10

20

【0145】

従来の固定化は、アッセイ手順の前に、捕獲試薬を不溶化することによって、水不溶性マトリックスまたは表面（米国特許第3,720,760号）または非共有結合性または共有結合性に吸着することによって（たとえば、米国特許第3,645,852号またはRotmans et al.; J. Immunol. Methods, 57:87-98 (1983)にて記述されたように、硝酸および還元剤での補助の活性化有りまたは無しで、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミド架橋を使用する）、または後に、たとえば免疫沈降によって達成する。いくつかの態様において、捕獲抗体は、ビオチンに抱合され、およびストレプトアビジン被覆した表面に結合される。その他の態様において、捕獲抗体は、HisタグまたはGSTなどのタンパク質タグに抱合され、および適切な表面、たとえばニッケルもしくは銅被覆した表面またはグルタチオン被覆した表面に結合される。

30

40

【0146】

固定のために使用される固相は、本質的に不水溶性および免疫測定アッセイにおいて有用な任意の不活性な支持体または担体でもよく、たとえば表面、粒子、多孔性マトリックスなどの形状の支持体を含む。一般に使用される支持体の例は、小さなシート、SEPHADEX（登録商標）ゲル、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズおよび96ウェルマイクロタイタープレートを含むポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンおよび同様のものから製造されたアッセイプレートまたは試験管、並びに濾紙、アガロース、架橋されたデキストランおよびその他の多糖などの微粒子材料を含む。あるいは、米国特許第3,969,287号；第3,691,016号；第4,195,128号；第4,247,642号；第4,229,537号および第4,330,440号において記述されたプロモシアン活性炭水化物および反応性基質などの反応性不水溶性マトリックスが、適切に捕獲試薬固定のために使用される。いくつかの態様において、固定化された捕獲試薬をマイクロタイタープレート上に被覆する。いくつかの態様において、使用される固相は、たとえばNUNC MAXISORB（商標）またはIMMULON（商標）として販売されるものなどのMICROTEST（商標）またはMAXISORB（商標）96ウェルELISAプレートを、一度にいくつかの試料を解析するために使用することができる複数ウェルマイクロタイタープレートである。

50

【0147】

固相を、上記のとおり捕獲試薬で被覆し、これを所望のとおり非共有結合性もしくは共有結合性相互作用または物理的な結合によって結合してもよい。付着のための技術は、米国特許第4,376,110号およびその中に引用された参照文献において記述されたものを含む。共有結合性である場合、プレートまたはその他の固相を、室温にて1時間などの当該技術分野において周知の条件下で捕獲試薬と共に架橋薬剤とインキュベートする。

【0148】

固相基体に捕獲試薬を付着するために一般に使用される架橋剤は、たとえば1,1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、たとえば4-アジドサリチル酸とのエステル、3,3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオン酸)などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、およびビス-N-マレイミド-1,8-オクタンなどの二官能性マレイミドを含む。メチル-3-(*p*-アジドフェニル)-ジチオ)プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下において架橋を形成することができる光活性化中間体を生じる。

10

【0149】

96ウェルプレートを利用する場合、これらは、少なくとも約10時間のインキュベーションによって、典型的には0.05M炭酸ナトリウムなどの緩衝液中に希釈された捕獲試薬の混合物で被覆してもよい。いくつかの態様において、インキュベーションは、少なくとも一晩、約4~20 または約4~8 の温度にて、および約8~12、約9~10または約9.6のpHである。より短い被覆時間(1~2時間)が望まれる場合、ニトロセルロース濾紙底面(Millipore MULTISCREEN(商標))と共に96ウェルプレートを使用すること、または37にて被覆することができる。プレートを積み重ねても、およびアッセイに長期先立って被覆してもよく、および次いで、手動、セミオートマチックまたはロボットを使用することによってなど自動様式でいくつかの試料について同時にアッセイを実施することができる。

20

【0150】

次いで、被覆プレートを、典型的には結合部位に非特異的に結合し、かつ飽和する遮断薬で処理して、プレートのウェル上の過剰部位への遊離リガンドの望まれない結合を妨げる。この目的のための適切な遮断薬の例は、たとえばゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、カゼインおよび脱脂乳を含む。遮断処理は、典型的には約1~4時間または約1.5~3時間、外界温度条件下で行われる。

30

【0151】

被覆および遮断後、適切に希釈した解析される標準(精製された関心対象の抗体)または生物学的試料を固定化した相に添加する。一定の態様において、希釈割合は、容積の約5~15%または約10%である。この目的のための希釈のために使用してもよい緩衝液は、(a) 0.5% BSA、0.05% TWEEN 20(商標)洗浄剤(P20)、0.05% PROCLIN(商標)300抗生物質、5mM EDTA、0.25% 3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンサルホナート(CHAPS)界面活性剤、0.2% ベータ-ガンマグロブリンおよび0.35M塩化ナトリウムを含むリン酸緩衝食塩水(PBS); (b) 0.5% ウシ血清アルブミン(BSA)、0.05% P20および0.05% PROCLIN(商標)300を含むPBS、pH 7; (c) 0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN(商標)300、5mM EDTAおよび0.35M塩化ナトリウム、pH 6.35を含むPBS; (d) 0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN(商標)300、5mM EDTA、0.2% ベータ-ガンマグロブリンおよび0.35M塩化ナトリウムを含むPBS; および(e) 0.5% BSA、0.05% P20、0.05% PROCLIN(商標)300、5mM EDTA、0.25%のCHAPSおよび0.35M塩化ナトリウムを含むPBS。PROCLIN(商標)300は、保存剤として作用し、およびTWEEN 20(商標)は、非特異的結合を除去する洗浄剤として作用する。

40

【0152】

使用される捕獲試薬の量は、標準との比較において優れたシグナルを与えるほど十分に多いが、試料において関心対象の抗体の最大の予想されるレベルと比較してモル過剰ではない。一定の態様において、添加される生物学的試料の量は、固定化された捕獲試薬が試料の適切な希釈後の生物学的試料において予想される関心対象の遊離抗体の最大モル濃度

50

のモル過剰であるようにする。この予想されるレベルは、患者の臨床条件で解析される特定の生物学的試料において関心対象の遊離抗体の濃度レベルの間の任意の公知の相関関係に主に依存する。したがって、たとえば成人患者は、非常に高い彼/彼女の血清中の関心対象の遊離抗体の最大の予想される濃度を有し得るが、一方で小児は、与えられた用量に基づいて彼/彼女の血清中により低レベル関心対象の遊離抗体を有することが予想されるだろう。

【0153】

捕獲試薬の濃度は、生物学的試料の任意の必要な希釈を考慮して、関心対象の抗体の関心対象の濃度範囲によって決定してもよい。また、捕獲試薬の最終濃度は、関心対象の範囲にわたってアッセイの感受性を最大にするように経験的に決定してもよい。一般に、モル過剰は、適切には、試料の任意の適切な希釈の後に生物学的試料において最大の予想される関心対象の抗体モル濃度の約10倍より低い。

10

【0154】

試料および固定化された捕獲試薬のインキュベーションのための条件は、アッセイの感受性を最大にするように、および解離を最小にするように、および試料中に存在する任意の関心対象の抗体が固定化された捕獲試薬に確実に結合するように選択される。インキュベーションは、たとえば室温にて、またはその近くで、約0 から約40 の範囲で、完全に一定の温度にて達成する。インキュベーション時間は、一般に約10時間を上回らない。種々の態様において、インキュベーション時間は、関心対象の抗体の捕獲試薬に対する結合を最大にするために、約0.5から3時間または約1.5~3時間、室温にて、またはその近くにてである。インキュベーションの期間は、生物学的液体におけるプロテアーゼが関心対象の抗体を分解することを妨げるためにプロテアーゼ阻害剤を添加する場合、より長くてもよい。

20

【0155】

この段階にて、インキュベーション混合物のpHは、通常約4~9.5の範囲に、または約6~9の範囲に、または約7~8の範囲にあるだろう。インキュベーション緩衝液のpHは、捕獲される関心対象の抗体に対する捕獲試薬の特異的結合の有意なレベルを維持するように選択する。この工程の間に所望のpHを達成し、および維持するために、ホウ酸、リン酸、炭酸、TRIS-HClまたはTRIS-リン酸、酢酸、バルビタールおよび同様のものを含む種々の緩衝液を使用してもよい。使用される特定の緩衝液は、本発明には重要でないが、個々のアッセイにおいて、一方の緩衝液がもう一方より好ましいかもしれない。

30

【0156】

随意的第2の工程

アッセイ法の随意的第2の工程では、生物学的試料を固定化された捕獲試薬から分離して(たとえば、洗浄することによる)、関心対象の非捕獲抗体を除去する。洗浄するために使用する溶液は、一般にインキュベーション工程について上記した考慮点および緩衝液を使用して決定されるpHをもつ緩衝液(「洗浄緩衝液」)であり、約6~9のpH範囲である。洗浄は、3回以上行ってもよい。洗浄の温度は、一般に冷蔵庫から中程度の温度まで、アッセイ期間中維持された一定温度で、典型的には約0~40 または約4~30 である。たとえば、洗浄緩衝液は、洗浄する前に貯蔵所において水中で4 に置くことができ、プレートワッシャーをこの工程のために利用することができる。また、関心対象の捕獲された抗体がその後の工程においてある程度まで分離するかもしれないというなんらかの懸念がある場合、架橋薬剤またはその他の適切な薬剤をこの段階にて添加して、現在結合した関心対象の抗体を捕獲試薬に共有結合させてもよい。

40

【0157】

第3の工程

次の工程では、任意の存在する関心対象の結合した抗体を伴う固定化された捕獲試薬を、使用した検出手段に主に依存的である2者の接触のための正確な温度および時間で、約20~40 または約36~38 の温度にて、検出可能な抗体と接触させる。たとえば、4-メチルウンベリフェリル- -ガラクトシド(MUG)、ストレプトアビジン-HRPまたはストレブ

50

トアビジン-β-ガラクトシダーゼを検出のための手段として使用するとき、最大にシグナルを増幅するために接触を一晩（たとえば、約15～17時間以上）実施してもよい。検出可能な抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体でもよいが、好ましくは、バックグラウンドノイズを減少させるために、これはモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、同じ抗イディオタイプ抗体がアッセイにおける被覆および検出のために使用される。その他の態様において、バックグラウンドノイズが最小にされるように、異なる抗イディオタイプ抗体を選択した被覆および検出のために使用することができる。

【0158】

いくつかの態様において、検出可能な抗体は、ヒト抗体に結合する非ヒト種由来の抗体である。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、抗hulIgG Fc抗体である。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、マウス抗hulIgG Fc抗体である。いくつかの態様において、検出可能な抗体は、直接検出可能である。一定の態様において、検出可能な抗体を、ビオチン化する。このような場合において、ビオチン化された標識のための検出手段は、アビジンまたはストレプトアビジン-HRPでもよく、および検出手段の読み出しは、蛍光定量または比色定量でもよい。いくつかの態様において、抗体は、HRPに抱合され、および検出手段は、比色定量である。

10

【0159】

予想される（上記のとおり）関心対象の遊離抗体の最大濃度に関して検出可能な抗体のモル過剰を、プレートを洗浄した後にこれに添加する。この抗体（直接または間接的に検出可能である）は、モノクローナル抗体であるが、任意の抗体を使用することができる。検出可能な抗体の親和性は、少量の関心対象の遊離抗体を検出することができるほど十分に高くなければならないが、関心対象の抗体を捕獲試薬から引き離させるほど高くない。

20

【0160】

第4の工程

アッセイ法の最終工程では、現在捕獲試薬に結合されている試料からの関心対象の任意の遊離抗体のレベルを、検出可能な抗体のための検出手段を使用して測定する。生物学的試料が臨床患者由来である場合、測定する工程は、標準曲線と上の3工程の結果として生じる反応を比較して、公知の量と比較した関心対象の抗体のレベルを決定することを含む。

30

【0161】

固定化された捕獲試薬に添加した抗体は、直接標識するか、または過剰な第1の抗体を洗浄した後に、第1の抗体の動物種のIgGに対して作られる第2の標識された抗体のモル過剰の添加によって間接的に検出するか、いずれかであろう。後者の間接アッセイでは、インサイチューで標識された抗体を生じるように、第1の抗体に対する標識された抗血清が試料に添加される。

【0162】

第1または第2の抗体いずれかのために使用される標識は、抗イディオタイプ抗体に対する関心対象の遊離抗体の結合を妨げない任意の検出可能な機能性である。適切な標識の例は、免疫アッセイにおける使用のための公知のこれらの多数の標識であり、蛍光色素、化学発光および放射性標識などの直接検出され得る部分、並びに検出されるために反応され、または誘導体化されなければならない酵素などの部分を含む。このような標識の例は、放射性同位元素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、および¹³¹I、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体などの蛍光団、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ（luciferases）、たとえばホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカライドオキシダーゼ、たとえば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼ、HRP、ラク

40

50

トペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために過酸化水素を使用する酵素と結合されたもの、ビオチン/アビジン、スピンラベル、バクテリオファージ標識、安定な遊離基等を含む。

【0163】

これらの標識を共有結合的にタンパク質またはポリペプチドに結合するために、従来法を利用できる。たとえば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビスイミダート、ビスジアゾ化ベンジジンおよび同様のものなどのカップリング薬剤を使用して、上記の蛍光、化学発光および酵素標識で抗体にタグを付けてもよい。たとえば、米国特許第3,940,475号(蛍光定量法)および米国特許第3,645,090号(酵素); Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol. Methods*, 40:219-230 (1981); および Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407-412 (1982)を参照されたい。

10

【0164】

酵素を含む、抗体に対するこのような標識の抱合は、免疫アッセイ技術の当業者にとって標準的な操作手順である。たとえば、O'Sullivan et al. "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," in *Methods in Enzymology*, ed. J. J. Langone and H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166を参照されたい。また、適切な市販の標識抗体を使用してもよい。

【0165】

最後の標識抗体の添加の後、結合した抗体の量を、洗浄することをによって過剰な結合していない標識抗体を除去すること、および次いで標識に適した検出方法を使用して付着した標識の量を測定すること、および測定された量を生物学的試料における関心対象の抗体の量と関連させることによって決定する。たとえば、酵素の場合、発色され、および測定される色の量は、存在する関心対象の抗体の量の直接の測定であろう。具体的には、HRPが標識である場合、色は、450nm読み込み波長および620または630nm参照波長を使用し、基質TMDを使用して検出され得る。

20

【0166】

一つの例において、第1の非標識抗体に対して作られる酵素標識された第2の抗体を固定化した相から洗浄した後、酵素の基質と共に固定化された捕獲試薬をインキュベートすることにより、色または化学発光を発色し、および測定する。次いで、関心対象の抗体の濃度を、平行して実行した関心対象の標準的な抗体によって生成される色または化学発光と比較することによって算出する。

30

【0167】

2. 質量分析

いくつかの態様において、抗HCMVイディオタイプ抗体は、抗HCMV抗体抗CIおよび/または抗gHのための質量分析アッセイにおいて使用される。本明細書において記述したアッセイは、生物学的試料からの抗HCMV抗体の免疫親和性捕獲のための抗HCMVイディオタイプ抗体を利用する。試料は、質量分光法による抗HCMV抗体の定量化の前に、クロマトグラフィーなどの分離技術を使用して、さらに処理してもよい。いくつかの態様において、特徴的ペプチド断片をタンパク質分解によって産生し、および選択したサインペプチドを抗HCMV抗体のための代替検体として測定する。一定の態様において、代替ペプチドは、タンデム質量分光法(MS/MS)による検出で、HPLCを使用して定量化される。

40

【0168】

生物学的試料のプロセッシング

抗CI、抗gHまたはこれらの組み合わせから選択される抗HCMV抗体を、ヒトなどの哺乳動物に投与し、または組織、細胞培養、血漿または血清から選択される生物学的供与源と接触させる。血清および血漿試料からの解析は、これらの高プロテオミクスバックグラウンド(すなわち、多くのタンパク質およびその他の検体)のため、問題があることが公知である。投与後の分、時間、日の範囲の一定の期間の後、抗HCMV抗体またはその断片を含む

50

生物学的試料を収集する。生物学的試料は、注射器またはカニューレによって液体を取り出すことを含む任意の手段によって収集していてもよい。生物学的試料は、血清、血漿もしくは同様のものまたは関心対象の抗体を含むその他の体液などの血液または血液製剤でもよい。

【0169】

生物学的試料を、製剤化すること、固定化すること、遠心分離、単離すること、消化すること、血液細胞凝固を誘導すること、もしくは防止すること、加水分解すること、または精製することを含む従来の手順によって解析試料を形成するために処理する。

【0170】

生物学的試料を処理することは、不純物を除去し、および試料成分の分離を妨げ、またはデータ収集もしくは解析を不明瞭にし得る試料不均一性を減少させるのに役に立つ。あるいは、または加えて、プロセッシングは、試料操作を単純化し、分解から保護し、試料容積を最小限にし、または質量分析解析における関心対象の試料成分（検体）を選択する。あるいは、または加えて、プロセッシングは、生物学的試料を、薬物代謝または薬物動態学的効果を決定する際の関心対象となる代謝産物、断片または誘導体に変換する。

10

【0171】

プロセスされた解析試料の捕獲

ビーズが投与した抗HCMV抗体に対して特異的な固定化された抗イディオタイプ抗体を有する免疫親和性ビーズ上に抗体を捕獲する。種々の態様において、抗イディオタイプは、本明細書において開示した任意の抗イディオタイプ抗体である。投与される抗HCMV抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体は、当該技術分野において公知の任意の好適な方法を使用して免疫親和性ビーズに抱合してもよい。いくつかの態様において、投与される抗HCMV抗体に対して特異的な抗イディオタイプは、ビオチン化し、および強力なビオチン-ストレプトアビジン相互作用 ($K_D=10^{-15}M$) を介してストレプトアビジン被覆した常磁性ビーズに結合される。ストレプトアビジンコートされた常磁性ビーズを使用するための理論的根拠は、以下を含む：(i) 強力なストレプトアビジン-ビオチン相互作用 ($K_D=10^{-15}M$)、(ii) 固定化されたストレプトアビジン/ビオチン化された検体は、証明された方法である、(iii) 高い結合能力（無傷のタンパク質のための十分な材料）、(iv) 低い非特異的結合、(v) 大量の分光測定適合性溶媒での試料の溶出、(vi) ビーズからの優れた試料回収および(vii) 使用の容易さおよび自動化に適する。

20

30

【0172】

免疫親和性ビーズは、多孔性重合体モノリスを含んでいてもよく、および収集貯蔵所と液体連通したフロールーチャンネルにおいて構成してもよい。ビーズは、カラムまたは漏斗などのフロールー容器に含まれてもよく、生物学的供与源からの試料は、一方の末端または開口部にて導入され、および試料は、もう一方の末端または開口部から溶出される。免疫親和性ビーズは、それぞれが分別の収集貯蔵所と連通している複数のフロールー容器に分配してもよい。容器および貯蔵所は、自動化および結果の再現性の目的のために12×8行および列の96マイクロタイターウェル形式または24×16行および列の384マイクロタイターウェル形式に構成してもよい。

【0173】

抗HCMV抗体を受けた哺乳動物（生物学的供与源）からの血漿または血清試料は、手動ピペティングまたは自動化されたロボットディスペンシングによってビーズに適用させる。ビーズは、ウェルまたはその他の容器に構成しても、またはカラムもしくは試料が一方の末端または開口部にて導入されて、洗浄溶離液または溶出した試料がもう一方の末端または開口部から溶出されるその他のフロールー装置に構成してもよい。ビーズに結合された抗イディオタイプ抗体に特異的な試料成分を結合させることができる。ビーズを洗浄して、非特異的タンパク質およびその他の非特異的試料成分をすすぎ出す。結合した抗体は、たとえばPNGaseFでビーズ上で非グリコシル化してもよい。結合した試料成分は、分離された受け取り容器またはウェルで、試料プレートに溶出させてもよい。次いで、溶出された試料を、手動ピペティングによってまたはロボット移動によって対処し、および

40

50

逆相クロマトグラフィーによって分離してもよく、および分離された試料成分を質量分析によって解析する。

【0174】

いくつかの態様において、生物学的試料をプロテアーゼで消化してもよい。特徴的ペプチド断片をタンパク質分解によって産生し、および選択したサインペプチドを、抗HCMV抗体のための代替検体として測定する。例示的な態様において、生物学的試料をトリプシン消化で消化してもよい。トリプシン消化のためには、試料をDTTで還元し、ヨウ化酢酸ナトリウムでS-カルボキシメチル化し、および次いでトリプシンで消化してもよい。消化された試料を分離法、たとえば逆相HPLC、たとえばNucleosil C18カラム；サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、たとえばTSK 3000SWxLカラム；またはTSK Boronateカラムを使用するポロナートアフィニティークロマトグラフィーによって解析してもよい。

10

【0175】

試料成分の分離

解析試料を形成するために、生物学的試料を分離媒体に適用して、複数の試料成分の分離を遂行してもよい。分離方法は、親和性、クロマトグラフィーおよび電気泳動法を含む。アフィニティー法は、アフィニティークロマトグラフィー、吸着および固定化された親和性マトリックスを含む。クロマトグラフィー法は、HPLC、疎水性相互作用（HIC）、陰イオン交換、陽イオン交換、逆相、順相、イオン対逆相、薄層、毛細管流およびサイズ除外を含む。ゲル電気泳動法は、一次元の、スラブゲル、キャピラリー、ポリアクリルアミド、変性、見変性、フリー溶液、紙、二次元、等電点分離法および勾配電圧を含む。その他の分離方法は、透析、遠心、沈降、浮上分離、沈澱、免疫沈澱およびゲル濾過を含む。

20

【0176】

分離方法は、溶出時間、疎水性、親水性、泳動時間、割合、速度、クロマトグラフィー保持時間、溶解性、分子体積またはサイズ、実効電荷、電荷状態、イオン電荷、等電位点、解離定数（pKa）、抗体親和性、電気泳動移動度、イオン化電位、双極子モーメント、水素結合能力および気相におけるイオン移動度を含むが、限定されない1つまたは複数の物理化学的特性によって生物学的試料の成分の分離を遂行してもよい。

【0177】

質量分析注入口装置への毛細管流注入による低流速は、質量検出の感受性を容易にし、無傷のタンパク質および抗体などのより低濃度のために検体およびより高分子量種を検出すること、および特徴づけることができる。

30

【0178】

分離した試料成分の質量分析

質量分光分析のための試料の調製は、一般に公知の技術に従って行うことができる。以下を参照されたい：“Modern Protein Chemistry: Practical Aspects”, Howard, G. C. and Brown, W. E., Eds. (2002) CRC Press, Boca Raton, Florida.

【0179】

本発明の方法は、生物学的試料に由来する抗体混合物の解析であって、混合物の異なる化学的成分が親和性またはクロマトグラフィーを含む1つまたは複数のプロセスによって最初に単離され、分離され、または部分的に分離されて、成分を連続もしくはバッチ様式で溶出させる、または質量分析によって直接検出させる解析に適切である。抗体の種々の構造的な特徴および特性は、断片化、アミド分解、グリケーション、酸化、部分配列情報、たとえばN末端およびC末端、二量体および凝集状態を含む質量分光分析から解明することができる。投与された抗HCMV抗体は、公知の配列、構造および分子量であるので、生物学的試料における1つまたは複数の化学的成分は、その正確な質量の測定によって高度に特異的な様式で特徴づけることができる。

40

【0180】

高質量精度、高感受性および高分解能でできる多様な質量分析システムが、当該技術分野において公知であり、および本発明の方法において使用することができる。このような質量分析計の質量アナライザーは、四極子（Q）、飛行時間（TOF）、イオントラップ、磁

50

気セクタもしくはFT-ICRまたはこれらの組み合わせを含むが、限定されない。量分析計のイオン源は、主に試料分子イオンまたは擬似分子イオンおよび一定の特徴づけられたフラグメントイオンをもたらすはずである。このようなイオン源の例は、大気圧イオン化源、たとえばエレクトロスプレーイオン化 (ESI) および大気圧化学イオン化 (APCI) およびマトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) を含む。ESIおよびMALDIは、質量分光分析のためのタンパク質をイオン化するための2つの最も一般的に使用される方法である。ESIおよびAPCIは、LC/MS (M. “LC/MS Applications in Drug Development” (2002) J. Wiley & Sons, New York) による小分子の解析のために最も一般に使用されるイオン源技術である。

【0181】

表面改良型レーザー脱離イオン化 (SELDI) は、高スループット質量分析が可能な表面に基づいたイオン化技術の施例である (米国特許第6,020,208号)。典型的には、SELDIは、タンパク質およびその他の生体分子の複合混合物を解析するために使用される。SELDIは、溶液中の検体、たとえばタンパク質と相互作用するために「タンパク質チップ」などの化学的に反応性の表面を使用する。このような表面が選択的に検体と相互作用して、その上にこれらを固定する。したがって、本発明の検体は、部分的にチップ上で精製することができ、次いで質量分析計において迅速に解析することができる。基体表面上の異なる部位に複数の反応性部分を提供することにより、スループットを増加させてもよい。

【0182】

機能的システムにおいて、質量分析計は、その正確な、または計算質量の20ppm以内に、および典型的にはその正確な、または計算質量の5ppm以下以内に関心対象の化学種の質量を正確に測定するだろう。市販の質量アナライザーは、同時に全部の質量スペクトルを、確実に質量分光計のシグナル強度またはピーク面積を定量的に表すように、混合物における複数の成分について十分なスペクトルを取得することができる周波数で、試料をとること、および記録することができる。また、これは、全ての質量について観察される溶出時間が質量アナライザーによって改変され、または歪められないだろうことを保証するだろうし、およびこれは、定量的測定が一過性シグナルの存在量を測定する必要があることによって損なわれないことを保証するのを補助するだろう。

【0183】

解析変動性は、標的検体のものに類似の物理化学的特性を有する内部標準 (IS) の使用によって修正してもよい。(Mesmin et al. (2011) *Bioanalysis* 3: 477-480)。いくつかの態様においてサイン、ペプチドが抗HCMV抗体のための代替検体として測定される場合、特徴的ペプチドに対応する安定同位元素標識した (SIL) ペプチドを内部標準として使用してもよい。(Hagman et al. (2008) *Anal. Chem.* 80: 1290-1296; Mesmin et al. (2010) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24: 2875-2884)。

【0184】

エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI)

より高い感受性は、検体イオン化効率の増加により、より低い流速にて達成される (Gale et al (1993) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:1017)。したがって、分範囲あたりナノリットルの流速での試料を含む液体のエレクトロスプレー注入を行うことにより、適切な較正後に正確な定量化および質量分析と組み合わせたときに液体内に含まれる検体について高感受性を提供する。高選択性および感受性、並びにMSに対するフロントエンドとしての正確な定性的な解析を提供するアフィニティークロマトグラフィー吸着剤を有する小型化され、および圧密化された微小カラムおよび微小カラムアレイを含むシステム、並びに装置が報告されている (米国特許第6,811,689号; 米国特許第6,020,208号; 米国特許第6,579,719号)。

【0185】

抗体などの比較的高い分子量化合物の質量は、大部分の質量分析計 (2000~3000までの典型的なm/z範囲) によって容易に決定される質量 電荷比 (m/z) にて検出することができる。エレクトロスプレーイオン化質量分析ESI-MSは、特に、荷電した、極性または塩基

10

20

30

40

50

性の化合物のために、および優れた検出限界で大幅に荷電された化合物を解析するために適する。したがって、ESIは、150,000またはより高い分子量(MW)をもつ抗体および抗体-薬物抱合体などの大きな生体分子の検出および特性付けが可能である。高い質量イオンにより、一連の大幅に荷電された分子イオンが、典型的には観察される。陽性イオンのための分子量は、電荷の数(n) マイナスカチオン(C^+)の質量かけるそのイオン上の電荷の数(n)を測定された m/z 比を乗じることによって決定される。

【0186】

ESI法は、断片化の有無を、界面レンズ電位を制御することによって制御することができる。エレクトロスプレーイオン化(ESI)は、液体の分離方法(フロントエンド)、並びに質量分光計の検出方法(バックエンド)と適合性である("Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, and Applications", Cole, R. B., Ed. (1997) Wiley, New York.)

10

【0187】

ESI-MSデータは、共に走査の数を平均化すること、およびデータを滑らかにして優れたピークの強度および形状を提供することによって取得し得る。低質量化合物については、観察される最も豊富なピークは、たいてい陽イオン様式で $[M+H]^+$ イオンおよび陰イオン様式で $[M-H]^-$ である。また、2倍および3倍に荷電したイオン、並びに二量体も観察され得る。2倍に荷電した陽性イオンは、質量($MW+2C^+$)/2にて観察され、式中MWは、分子量であり、および C^+ は、 H^+ 、 Na^+ または NH_4^+ などのイオン化するカチオンである。非常に低質量の化合物を除いて、検出イオンは、大幅に荷電されるだろう。ESIのソフトな(低イオン化電位)条件のため、典型的には分子イオンだけが観察される。ESIスペクトルは、イオンが有する種々の電荷数のために、質量電荷比が異なるいくつかの分子イオンピークを有し得る。

20

【0188】

試料、たとえばADCまたはその他の生体分子の希釈溶液は、ESI-MS解析のために皮下針を介してゆっくりポンピングしてもよい。試料は、フローインジェクションまたはLC/MSを経て導入してもよい。典型的な流速は、毎分1マイクロリットル未満(μl)から毎分約1ミリリットル(ml)までの範囲である。ESIは、そうでなければ蒸発させ、またはイオン化するのが困難である大きな生体分子に特に適する。針は、高電圧に保たれ、および針の末端における強力な電界が、霧状にされた溶液を荷電し、および荷電した液滴を生じる。荷電した液滴は、水を蒸発して、最終的に分子イオンを生じ、これが小さな開口部を介して真空チャンバに移動する。溶媒蒸発のプロセスの間、非共有結合で結合した複合体は、溶液から気相へ移動する。(Hu et al (1994))。無傷の気相複合体を維持するために、穏やかな脱溶媒和状態が一般に必要とされる。開口部を、イオンが完全に脱溶媒和されることを確実にするために加熱してもよい。いくつかのMSシステムは、逆に流れる加熱された気体を使用してもよい。荷電した液滴は、皮下針から排出されて、これらが真空チャンバに入る前に溶媒を蒸発するにつれて縮む。熱およびガス流を、脱溶媒和を補助するために使用してもよい。ESI測定のために必要とされる試料の量は、小さなキャピラリーエレクトロスプレーエミッタ、チップ、ナノエレクトロスプレーとして公知のプロセスの使用によって流体の流れを減少させることによって減少され得る。ナノエレクトロスプレー法は、 $1\mu l$ 試料について約10~30分間一定のシグナルを生じることができる。低フローは、イオン効率を上昇させて、イオン抑制を減少させることが示されている。ナノエレクトロスプレー法は、MS/MSタンパク質研究のために頻繁に使用される(Korner et al (1996) J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7:150-156; Mann, M. and Wilm, M. (1996) Anal. Chem. 68:1-8.)

30

40

【0189】

タンパク質のESIは、大幅に荷電したイオンを生じ、電荷の数が分子量増大として増大する傾向がある。所与のイオン性種での電荷の数は、(i)1つの電荷によって異なる2つの電荷状態を比較すること、および連立方程式を解くこと；(ii)同じ電荷を有するが、異なる付加物質量を有する種を見つけること；および(iii)解かれた同位体的クラス

50

ターについて質量 電荷比を調べることなどの方法によって決定し得る。ESIおよびESI-MSの方法、並びにこれらの方法を行うために必要なパラメーターは、当該技術分野において周知である。エレクトロスプレーイオン化過程の穏やかさにより、無傷の抗体複合体を質量分析によって直接検出することができる。

【0190】

一つの態様において、タンパク質、抗体、抗体断片または抗体複合体（大分子）のQ1質量スペクトルは、本方法の一部として実行される。大分子の適切な品質Q1質量スペクトルを得ることができる。タンパク質エンベロープが変化する可能性があるため、クロマトグラフィのために使用される全ての溶媒は、新たに作製し、および酸を溶出溶媒に添加して、観察される範囲にスペクトルエンベロープを位置させる。100,000質量ユニットを超えるタンパク質について、ギ酸などの酸を溶出溶媒、たとえばA（水）およびB（アセトニトリル）の両方の溶媒中に約0.1%（容積）にて使用することができる。100,000質量ユニット未満であるタンパク質についてAおよびB溶媒の両方のために、0.05%（容積）TFAにて、トリフルオロ酢酸（TFA）など、より強力な酸を使用することができる。ギ酸の量が減少すると、無傷のグリコシル化された抗体、トラスツズマブは、より多くの電荷を拾い上げ、さらにエンベロープを左に、および m/z （1800-3000 m/z ）の観察される範囲に移動する。脱クラスティング電位（DP）電圧が約30-120V～約70-190Vまで増大されると、抗体上の電荷がさらに増加する。したがって、適用される電圧、溶媒組成物およびイオンペアリング薬は、考慮し、および調整する因子である。脱クラスティング電位（DP）は、最善の電荷イオン範囲を選択するのに十分な分解能を得るために、増加して（勾配をつけて）もよい。直線性は、 m/z の広範囲にわたって得られ得る。抗体の脱グリコシル化は、無傷の抗体または重鎖、断片もしくはADCの定量化を助ける。グリコシル化は、より低いイオン化効率に寄与し、およびしたがって感受性を減少させた。定量化抗体または抗体断片を抱合するときに、抗体の脱グリコシルは、質量スペクトルの不均一性を減少させて、感受性を増大し、およびしたがって解析を単純化し得る。

【0191】

逆重畳積分表は、それぞれの種を定量化するための正確な質量電荷比（ m/z ）を決定するために使用される。Analyst.TM.QS（Applied Biosystems、Foster City, Calif）などの逆重畳積分ソフトウェアアプリケーションが、市販で、および/または質量分析計と共に提供される。逆重畳積分ソフトウェアは、一般に逆重畳積分された質量の表、並びにこれらの質量を算出するために使用される m/z イオンのサブテーブルを使用者に提供する。

【0192】

E. キット

利便性の問題として、本発明のアッセイ法は、キットの形成で提供することができる。このようなキットは、以下の基本要素を含むパッケージされた組み合わせである：

- (a) 関心対象の抗体に対する抗イデオタイプ抗体で構成された捕獲試薬；
- (b) 関心対象の抗体に結合する検出可能な（標識された、または標識のない）抗体；

および、

- (c) これらの試薬を使用してアッセイ法を行う方法についての説明書。

これらの基本要素は、先に定義してある。

【0193】

キットは、捕獲試薬のための固体支持体をさらに以下を含んでもよく、これは分離した要素として提供してもよく、またはその上にすでに捕獲試薬が固定されている。それ故、キットにおける捕獲抗体は、固体支持体上に固定してもよく、またはこれらは、キットと共に含まれる、またはキットとは別々に提供されるこのような支持体上に固定してもよい。いくつかの態様において、捕獲試薬は、マイクロタイタープレート上に被覆される。検出可能な抗体は、直接検出される標識された抗体または異なる種において産生された標識のない抗体に対して作られた標識抗体によって検出される標識のない抗体でもよい。標識が酵素である場合、キットは、酵素によって必要とされる基質および補因子を通常含むだろうし；標識が蛍光団である場合、検出可能な発色団を提供する色素前駆体；および

標識がビオチンである場合、HRPまたはMUGと共に0-ガラクトシダーゼに抱合されたアビジン、ストレプトアビジンまたはストレプトアビジンなどのアビジン。

【0194】

種々の態様において、抗イディオタイプ抗体は、本明細書において開示した抗イディオタイプ抗体のいずれかの1つまたは複数である。いくつかの態様において、抗イディオタイプ抗体は、(a) 配列番号：5の重鎖配列および配列番号：7の軽鎖配列を含む第1の抗イディオタイプ抗体；(b) 配列番号：9の重鎖配列および配列番号：11の軽鎖配列を含む第2の抗イディオタイプ抗体；および(c) これらの組み合わせから選択される。

【0195】

また、キットは、典型的には標準として関心対象の抗体（たとえば、精製した抗CIおよび/または抗gH）、並びに安定剤、洗浄およびインキュベーション緩衝液および同様のものなどのその他の添加剤を含む。

【0196】

キットの構成要素は、予め定められた比で、アッセイの感受性を実質的に最大にする試薬の溶液中の濃度を提供するように適切に変化された種々の試薬の相対的量で提供されるだろう。特に、試薬は、通常凍結乾燥された乾燥粉末として、賦形剤を含んで提供してもよく、これは溶解時に、試験される試料と組み合わせ競るための適切な濃度を有する試薬溶液を提供するだろう。

【実施例】

【0197】

以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上で提供した一般的な記述を考慮して、種々のその他の態様が実践されてもよいことが理解される。

【0198】

実施例1：抗抗CIおよび抗gHハイブリドーマの生成

5匹のBalb/cマウス(Charles River Laboratories International, Inc, Wilmington, MA, USA)を、代謝性スクアレン、Tween 80、トレハロース6,6-ジミコラートおよびモノホスホリルリピドA(Sigma Aldrich, USAから全ての成分を得た)を含むアジュバント中の抗CIまたは抗gHを用いて、各後足蹠および腹腔内において、3~4日の間隔にて過免疫した。4~6回の追加免疫後、血清力価を標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)法によって評価して、抗CIまたは抗gHに対する陽性血清力価を有するマウスを同定した。脾臓および膝窩リンパ節からのB細胞をマウス骨髄腫細胞(X63.Ag8.653またはP3X63Ag.U1; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)と電気融合(Hybrimmune-Hybridoma Production System; Harvard Apparatus, Inc., Holliston, MA, USA)によって融合した。10~14日後に、ハイブリドーマ上清を収集してELISAによってCDR特異的抗体産生についてスクリーニングした。次いで、全ての特異的クローンを予備HCMV PK ELISAにおいて再スクリーニングし、これにはELISAプレートを被覆して抗CIおよび抗gHを捕獲するための試薬として候補抗ID材料を使用し、ポリクローナル抗ヒト抗体を検出試薬として使用した。ハイブリドーマクローン1.9E1.1、4.25B10.15および2.41A2.4は、1回目のウェルあたりの単一細胞サブクローニング(FACS Aria cell sorter; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)後、予備HCMV PK ELISAにおいて高い特異的結合を示し、およびしたがって、抗体産生のためにスケールアップした(Innova 2000 Shake Flask Format; New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA)。PKアッセイにおけるクローン2.41A2.4の結合パターンは、このクローンがラムダ軽鎖フレームワークを含むエピトープに結合することを示唆した。上清をアフィニティークロマトグラフィーによって精製し(MabSelect SuRe; GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)、滅菌濾過し、およびPBS中で4にて貯蔵した。モノクローナル抗体のアイソタイプを、Isostrip Mouse mAb Isotyping Kit(Roche Applied Biosciences, Indianapolis, IN, USA)を使用して決定した。アイソタイプは、IgG1、ラムダ(1.9E1.1)、IgG1、カッパ(4.25B10.15)およびIgG2a、カッパ(2.41A2.4)であると決定した。

【0199】

表2に示したように、モノクローナル抗体の結合親和性をBiacore解析によって決定した。

【 0 2 0 0 】

【 表 2 】

モノクローナル抗体	結合した抗体	結合親和性
4.25B10.15	抗 C1	4.7 nM
2.41A2.4	抗 C1	17 nM
1.9E1.1	抗 gH	0.1 nM

10

【 0 2 0 1 】

4.25B10.15について図1および2、並びに1.9E1.1について図3および4に示したように、モノクローナル抗体4.25B10.15および1.9E1.1について重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を決定した。

【 0 2 0 2 】

図1に示したモノクローナル抗体4.25B10.15の重鎖の超可変領域は、以下の通りである：

HVR-H1 NYLIE 配列番号：13
 HVR-H2 VINPGSGGTNYNEKFEA 配列番号：14
 HVR-H3 HGSSYWYFDV 配列番号：15。

20

【 0 2 0 3 】

図2に示したモノクローナル抗体4.25B10.15の軽鎖の超可変領域は、以下の通りである：

HVR-L1 RASQSISDYLH 配列番号：16
 HVR-L2 YASQSIG 配列番号：17
 HVR-L3 QNGHSFPYT 配列番号：18。

【 0 2 0 4 】

図3に示したモノクローナル抗体1.9E1.1の重鎖の超可変領域は、以下の通りである：

HVR-H1 DYWMY 配列番号：19
 HVR-H2 AIDTSDSYTTYNQNFKG 配列番号：20
 HVR-H3 SGFPLFYYPMDY 配列番号：21。

30

【 0 2 0 5 】

図4に示したモノクローナル抗体1.9E1.1の軽鎖の超可変領域は、以下の通りである：

HVR-L1 RSSTGAVTTSNYAN 配列番号：22
 HVR-L2 GTVNRAP 配列番号：23
 HVR-L3 ALWYSNHLV 配列番号：24。

【 0 2 0 6 】

実施例2：抗gHの検出のためのELISAアッセイ

40

抗gHの検出のために使用したELISAアッセイ（「抗gH臨床的PK ELISA」という）の概略図を図5に示した。抗gHに対するビオチン抱合抗イディオタイプ抗体をストレプトアビジン被覆マイクロプレートに結合して、試料における抗gHを検出するために使用した。結合した抗gHを、HRP抱合マウス抗ヒトIgG Fcg抗体を使用して検出した。

【 0 2 0 7 】

ビオチン抱合抗イディオタイプ抗体は、アッセイ希釈剤（PBS/0.5% BSA/0.05% ポリソルベート20/0.35M NaCl/0.25% CHAPS/5mM EDTA/0.05% ProClin 300、pH 7.4±0.1）中500 ng/mLで希釈した。Roche SAプレートは、使用の前に洗浄緩衝液（PBS/0.05% ポリソルベート20、pH7.46）で使用の前に3回洗浄した。50 μl/ウェルのビオチン抱合抗イディオタイプ抗体（1.9E1.1）をストレプトアビジン被覆プレートに添加して、プレートを室温に

50

て25～35分間攪拌しながらインキュベートした。曲線標準、アッセイ対照または試料をアッセイ希釈剤（上記した）中で1：50に希釈した。希釈した試料、曲線標準およびアッセイ対照をプレートに添加し、および室温にて100～130分間攪拌しながらインキュベートした。プレートを4回洗浄した。100 μ l/ウェルのHRP抱合マウス抗hulIgG Fc（8ng/ml）を添加し、およびプレートを室温にて1時間 \pm 5分間振盪しながらインキュベートした。プレートを4回洗浄し、100 μ l/ウェルのTMBを添加した。プレートを室温にて10～15分間攪拌しながらインキュベートした。100 μ lの1Mリン酸を各ウェルに添加した。プレートを450nm読み込み波長および620または630nm参照波長を使用して読んだ。

【0208】

図6は、予備抗HCMVヒトPK ELISAにおいて試験したときの抗CIおよび抗gHに対する種々の抗イデオタイプ抗体の結合活性を示す。アッセイは、以下の通りに実施した：マイクロタイターELISAプレートをPBS中の1 μ g/ml抗イデオタイプモノクローナル抗体にて一晚被覆した。抗CIおよび抗gHを1% NHS中で希釈してウェルに添加し、その後50ng/mL HRPヒツジ抗hulIgG（ウェル内の濃度）で検出した。

10

【0209】

図6に示したように、1つの抗イデオタイプ抗体、1.9E1.1、のみが、抗gHの非存在におけるODの2倍を超えて、抗gHの存在において光学濃度（OD）を示した。その他の抗イデオタイプ抗体は、高いバックグラウンドODを示し、ヒト血清（NHS）における内因性IgGとこれらの抗イデオタイプ抗体の交叉反応を示唆する。

【0210】

個々のドナーからの血清に加えられた抗gHの量を定量化するために、抗gH臨床PK ELISAを使用した。抗gHをそのままの血清に高（2 μ g/mL）または低（0.3 μ g/mL）いずれかの濃度で加えた。図7は、捕獲抗体として1.9E1.1を使用して抗gHを加えた個々の血清のパーセント回収率を示す。アッセイは、低および高抗gH濃度の両方にて加えた抗イデオタイプ抗体1.9E1.1が全ての個々の血清で優れた精度を提供したことを示した。

20

【0211】

実施例3：抗CI検出のためのELISAアッセイ

図8は、抗CI検出のために使用したELISAアッセイ（「抗CI臨床的PK ELISA」という）の概略図である。抗CIに対する抗イデオタイプ抗体をマイクロプレートに結合して、試料における抗CIを検出するために使用した。結合した抗CIを、HRP抱合マウス抗ヒトIgG Fcg抗体を使用して検出した。

30

【0212】

マイクロタイタープレートを1ウェルにつき100 μ lの0.75 μ g/ml抗CIイデオタイプ抗体（0.05Mの炭酸ナトリウム緩衝液中、pH9.6 \pm 0.1）にて2～8 にて一晚被覆した。プレートを洗浄緩衝液のサイクルあたり、1ウェルにつき400 μ lで3回洗浄した。1ウェルにつき200 μ lのブロッキング緩衝液（PBS/0.5% BSA/0.05% ポリソルベート20/0.05% ProClin 300、pH7.4 \pm 0.1）を添加し、およびプレートを1～3時間室温にて振盪しながらインキュベートした。標準曲線は、標準/試料希釈剤で調製した（0.5%の通常のスプーンしたヒト血清を伴うアッセイ希釈剤；アッセイ希釈剤は、PBS/0.5% BSA/0.05%のポリソルベート20/0.35 M NaCl/0.25% CHAPS/5mM EDTA/0.05% ProClin 300、pH7.4 \pm 0.1で構成される）。プレートを洗浄緩衝液のサイクルあたり、1ウェルにつき400 μ lで3回洗浄した。希釈された標準、対照および試料を、二つ組で1ウェルにつき100 μ lにてプレートに添加した。プレートを2時間 \pm 10分間室温にて振盪してインキュベートした。プレートを洗浄緩衝液のサイクルあたり、1ウェルにつき400 μ lで4回洗浄した。抱合緩衝液（PBS/0.5% BSA/0.05% ポリソルベート20/0.05% ProClin 300、pH7.4 \pm 0.1）中に希釈したHRP抱合体を1ウェルにつき100 μ lにて添加した。プレートを1時間 \pm 5分間室温にて振盪してインキュベートし、その後、プレートを洗浄緩衝液のサイクルあたり1ウェルにつき400 μ lで4時間洗浄した。1ウェルにつき100 μ lのTMB基質を添加して、プレートを室温にておよそ15分間振盪しながらインキュベートした。100 μ lの1Mリン酸を各ウェルに添加した。プレートを450nmの読み込み波長および620または630nmの参照波長を使用して読んだ。

40

50

【0213】

被覆濃度を最適化するために、種々の濃度の捕獲抗体4.25B10.15で被覆したプレートを使用して、抗CI臨床PK ELISAアッセイを実施した。表3に示したように、0.75mg/mlの抗体4.25B10.15で被覆されたプレートは、最適なシグナル対バックグラウンド比を示した。バックグラウンド (bkgd) は、添加なしのヒト血清で得られたアッセイシグナルに等しい。

【0214】

【表3】

4.25B10.15 (73427-34)でのプレート被覆						
8G8 (μg/mL)	被覆 シグナル/ バックグラウン ド比率		被覆 シグナル/ バックグラウン ド比率		被覆 シグナル/ バックグラウン ド比率	
	1μg/mL	13.8	0.75μg/mL	19.1	0.5μg/mL	14.7
16	1.876	13.8	1.593	19.1	1.281	14.7
8	1.771	13.0	1.378	16.5	1.075	12.3
4	1.371	10.0	1.107	13.3	0.901	10.4
1	0.599	4.4	0.439	5.3	0.379	4.3
0.5	0.372	2.7	0.271	3.2	0.231	2.7
0.25	0.254	1.9	0.174	2.1	0.161	1.8
0.125	0.194	1.4	0.128	1.5	0.120	1.4
bkgd	0.136		0.084		0.087	

10

20

【0215】

抗CI臨床PK ELISAを、種々の濃度で0.5%のヒト血清プールに添加された抗CIを使用して標準曲線と共に実行した。結果を表4に要約してある。アッセイは、一貫した用量応答および抗CIの濃度増大につれてますます高いシグナル対バックグラウンド (S/B) 比を示した。

【0216】

【表4】

抗CI ug/mL	OD	S/B 比率
20	1.970	22.3
10	1.725	19.6
5	1.203	13.6
2.5	0.743	8.4
1.25	0.431	4.9
0.625	0.261	3.0
0.313	0.174	2.0
0.156	0.134	1.5
bkgd	0.088	

30

40

【0217】

捕獲抗体として抗イディオタイプ抗体4.25B10.15または4.23F9.5を使用して個々のドナーからの血清に加えられた抗CIの量を定量化するために、抗CI臨床的PK ELISAを使用した。抗CIをプール試料および試料1~4について4μg/mL (高) または0.5μg/mL (低) いずれかにて; 試料5について12μg/mL (高) または0.6μg/mL (低) いずれかにて、および試料6および7について7.62μg/mL (高) または0.476μg/mL (低) いずれかにて加えた。図9に示したように、抗イディオタイプ抗体4.25B10.15は、4.23F9.5より優れて遂行され、高および低抗CI濃度の両方にて、全ての試料について正確な添加回収を提供した。

【0218】

実施例4: ヒト血清における抗CIおよび抗gHの定量化のためのLC-MS/MSアッセイ

LC-MS/MSアッセイは、ヒト血清における抗CIおよび抗gHの定量化のために開発された。

50

アッセイは、免疫親和性捕獲を使用して、ヒト血清から2つのモノクローナル抗体、抗CIおよび抗gHを単離する。次いで、特徴的ペプチド断片を、トリプシンを用いて、結合した抗体のタンパク質分解によって産生し、選ばれたサインペプチドを、これらの安定な同位元素標識された内部標準 (SIL IS) と共に、MS/MS検出を備えたHPLCを使用して抗CIおよび抗gHのための代替検体として測定した。抗CIおよび抗gHについてのサイントリプシンペプチドは、以下に示したとおりであった：

- 抗CI (P2) EQFVYVFGGGTK (配列番号：25)
 - 抗CI (P4) DTSTSTAYLELSSLR (配列番号：26)
 - 抗gH (P2) GLEWVSSINSNSR (配列番号：27)
 - 抗gH (P5) LSC*AASGFTFSPYSVFWVR (配列番号：28)
- * アルキル化システイン残基。

10

【0219】

SIL ISは、太字体で示したアミノ酸位置にて安定な同位元素標識されたアミノ酸を含む：

- 抗CI (P2) EQFVYVFGGGTK (配列番号：25)
- 抗CI (P4) DTSTSTAYLELSSLR (配列番号：26)
- 抗gH (P2) GLEWVSSINSNSR (配列番号：27)
- 抗gH (P5) LSC*AASGFTFSPYSVFWVR (配列番号：28)

* アルキル化システイン残基。

20

【0220】

サインペプチド抗CI (P2) および抗gH (P2) は、それぞれ抗CIおよび抗gHの定量化のために使用される一次代替ペプチドであり、抗CI (P4) および抗gH (P5) は、品質対照目的のために使用される二次代替ペプチドであった。方法は、0.100 ~ 20.0 μg/mLの公称範囲内で、抗CIおよび抗gHの定量化に適用できる。25 μLのヒト血清の一定分量は、解析のために十分である。試料は、ポリプロピレンチューブに貯蔵し、および解析前におよそ-70にて凍結保持した。

【0221】

以下の試料タイプを評価目的のために抽出した。注記した場合を除き、抗イディオタイプモノクローナル抗体 (抗ID mAb) 負荷は、試料あたり各々3.0 μgであった：

プールしたブランクの (MB) ヒト血清。

30

【0222】

それぞれの抗体について抗CIおよび抗gH (混合) を以下の濃度にて添加した較正標準 (CALs) : 0.100、0.200、0.400、1.00、4.00、8.00、10.0および20.0 μg/mL (各レベルn=2)。

【0223】

各抗体について抗CIおよび抗gH (混合) を以下の濃度にて添加した品質対照 (QCs) : 0.250、2.00、7.50 μg/mL (各レベルn=4)。

【0224】

高キャリブレーター後のキャリーオーバーブランク (CB)。

【0225】

40 μg/mLの抗CIおよび抗gH濃度に調製し、および分注前に10倍に希釈した、曲線を超えた希釈QC (DIL QC)。

40

【0226】

6人の個々のヒトドナー (各n=1) からの特異性試料 (SP)。

【0227】

0.200 μg/mLの濃度にて抗CIおよび抗gHを添加した6人の個々のヒトドナーからの添加された特異性試料 (SPF 's)。

【0228】

抗CIおよび抗gH (混合) を以下の濃度にて添加したさらなる較正標準 (混合) : 0.100、0.200、0.400、1.00、4.00、8.00、10.0および20.0 μg/mL (各レベルn=2) および各試

50

料あたり1.50 μg の抗CI抗ID mAbおよび抗gH抗ID mAbの添加を含む。

【0229】

解析のための試料は、以下工程によって処理した：

1. プレートコンディショニング緩衝液 (0.1 : 5.0 : 3.0 : 0.2 : 91.7 : 0.1 Tween 20/Trizma HCl (1M) /NaCl (5M) /EDTA (0.5M) /水/ウシ血清アルブミン、v/v/v/v/w) 275 μl を添加することによって、Immulon 1B96ウェル、平底マイクロタイタープレート (Thermo、Product No. 3355) をあらかじめ調整する。プレートをおよそ1分間、ボルテックスで穏やかに攪拌する。プレートを反転することによってコンディショニング緩衝液を捨て、および吸収パッドの上でプレートを軽くたたき乾燥させる。

【0230】

2. 25 μl の血清試料一定分量を3.0 μg または1.5 μg の抗CI抗ID mAb、3.0 μg または1.5 μg の抗gH抗ID mAbおよび10mM HBS-EP緩衝液 (GE Healthcare、製品番号94318) の混合物に添加し、あらかじめ調整した96ウェルマイクロウエルプレートに150 μl の総体積にする。

【0231】

3. 接着フィルムでプレートをカバーし、およびタイタープレートシェーカー上で一定の穏やかな振盪下で2時間室温 (RT) にてインキュベートする。

【0232】

4. ストレプトアビジンダイナビーズ M-280 (Life Technologies、製品番号602-10) の必要な容積を (ウェルあたり100 μl に基づく) 1~2分間RTにて混合することにより10mM HBS-EPと同等の容積で、緩衝液と交換する。この手順を3回繰り返す。上清を捨てた後、容積を50 μl まで10mM HBS-EPで補い、その結果ビーズは、最初に始めた容積と比較して2倍に濃縮される。

【0233】

5. 次いで、50 μl の濃縮ビーズを工程3から各ウェルに添加し、および一定の穏やかな振盪下で2時間RTにて結合させる。

【0234】

6. 外部の磁石 (Biotek 96-well Flat Magnet) およびBiotekプレートウォッシャーを使用して磁気ビーズを分離し、および上清中の結合していないタンパク質を捨てる。ビーズを、ビーズプレートウォッシャーを使用して、75 μl のビーズ洗浄緩衝液 (5.0 : 3.0 : 0.2 : 91.8 Trizman HCl (1M) /NaCl (5M) /EDTA (0.5M) /水、v/v/v/v) で3回洗浄する。外部の磁石を使用してビーズが分離された後に、上清を捨てる。タイタープレートシェーカーを使用して、ビーズを再懸濁するために各々3回の洗浄の間にタイタープレートを振盪する。

【0235】

7. 200 μl のビーズ洗浄緩衝液でビーズの4回目の洗浄をし、外部の磁石を使用してビーズが分離された後に上清を捨て、および再懸濁するためにタイタープレートシェーカーを使用して、短時間振盪する。

【0236】

8. 磁気ビーズを分離し、および上清を捨てる。75 μl のビーズ洗浄溶液 (20%アセトニトリル水) でビーズを1回洗浄し、およびおよび再懸濁するためにタイタープレートシェーカーを使用して、短時間振盪する。磁気ビーズを分離し、および上清を捨てる。最後にビーズ洗浄溶液でビーズを洗浄し、およびおよび再懸濁するためにタイタープレートシェーカーを使用して、短時間振盪する。

【0237】

9. 洗浄液を捨てた後、75 μl のRapigest界面活性剤溶液 (0.05 : 40 : 10 Rapigest (Rapigest SF surfactant、Waters、製品番号186002122) /重炭酸アンモニウム、50mM/ACN、w/v/v)、25 μl の内部標準 (または内部標準希釈剤、すなわち20%アセトニトリル水) および10 μl のDTT (0.1M) を各ウェルに添加する。プレートを~1時間予熱したオープンにおいて60 にてインキュベートする。

【0238】

10

20

30

40

50

10. 各ウェルに25 μ Lのヨードアセトアミド (iodoacetamide) (0.1M)を添加する。十分に混合する。~0.5時間(光から保護して)、RTにてインキュベートする。

【0239】

11. 各ウェルに25 μ gのトリプシンを添加する。十分に混合する。37 $^{\circ}$ Cにて一晚(16~20時間)インキュベートする。

【0240】

12. 各ウェルに15 μ Lの2M HClを添加する。十分に混合する。~0.5時間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートする。

【0241】

13. 磁石の上にプレートを置き、および96-well Eppendorf Lo-bindコレクションプレートの上に置いたMulticreen HTS Filter Plate (Millipore、部品番号MSHVN4550)に全ての溶液を移す。

10

【0242】

14. 濾液を収集するために、3000rpmにて5分間フィルタープレート/コレクションプレートを組み合わせたものを遠心分離する。

【0243】

15. 注入マットでプレートを封止して、およびLC/MS/MSシステムに15 μ Lを直接注入する(10 μ L注入ループ上)。

【0244】

データ整理

20

データシステムは、MCMV3068A、MCMV5322A、および内部標準の領域を自動的に算出し、および注釈をつけるように構成した。校正曲線を二次式、1/濃度加重二乗、最小二乗回帰アルゴリズムを適用することによって、校正標準のピーク領域比率(PARs)を使用して構築した。次いで、全ての濃度を、校正ラインに対するこれらのPARsから算出した。

【0245】

全てのサインペプチドについて、0.100から20.0 μ g/mLまでの抗CIおよび抗gH両方の検体の校正範囲を拡張することが可能であることを、最初の実験は証明した。二次回帰(1/x²加重)を抗CIおよび抗gHのために適用した(各抗ID mAb1.5 μ g添加である)。

【0246】

加えて、アッセイ特異性を複数の個体血清ロットにおいて試験し、品質対照(QC)試料を校正標準に対して調製し、および定量化した。優れた精度および精密なデータを全ての4つのサインペプチドのためのQCについて得た。曲線を越えた希釈QC試料は、曲線範囲においてうまく希釈された。一次および二次ペプチドの一致領域比を両方の検体に対して観察した。特異性試料は、検体滞留時間にて何らの干渉の存在を示さなかった。添加された特異性試料は、ロット間マトリックス効果の何らの有意な証拠を示さなかった。

30

【0247】

各抗イディオタイプ抗体に対する1.5 μ gの抗イディオタイプ添加を使用して、以下の通りに、アッセイをさらに評価した。抗イディオタイプ抗体2.41A2.4を抗CIの検出のために使用し、抗イディオタイプ抗体1.9E1.1を抗gHの検出のために使用した。それぞれ0.100から20.0 μ g/mLまでの抗CIおよび抗gHの範囲の少なくとも8つのキャリブレーション位置にて、2つのセットの標準曲線を実行した；1つの曲線は、試料のバッチの始めにて、および1つは最後にて。校正標準の逆算出値は、名目濃度の \pm 20%以内にあることが必要であった。標準の逆算出濃度が許容される範囲の外側である場合、その標準は除外し、および全ての残りの値が許容される範囲内になるまで校正データの回帰分析を繰り返した。許容できる校正曲線については、少なくとも6つのキャリブレーションレベルが示され、および除外後に、実行における全校正標準の最低75%が残っていた。以下のタイプのそれぞれの少なくとも1つのブランク試料を解析した：(a)内部標準なしの試薬ブランク；(b)内部標準なしのマトリックスブランク；および(c)内部標準ありのマトリックスブランク。

40

【0248】

定量化の下限(LLOQ)、低、中および高レベルQC試料(n=6)をアッセイ内の精密さお

50

よび精度を評価するために実行した。表5に示したように、抗CIおよび抗gHのLLOQ濃度については、アッセイ内変動係数は、アッセイ内の反復測定について25.0%（許容基準）未満であり、および平均精度は、理論的な検体濃度の $\pm 25.0\%$ （許容基準）以内であった。抗CIおよび抗gHの全てのその他の濃度については、アッセイ内変動係数は、アッセイ内の反復測定について20%未満であり、および平均精度は、理論的な検体濃度の $\pm 20.0\%$ 以内であった。したがって、アッセイは、薬物濃度の広範囲にわたって許容される精密さおよび精度を示す。

【0249】

元来標準曲線の上限より上の試料を希釈する能力を評価するために、さらなる「曲線上の」マトリックス品質対照プールをおよそ600 $\mu\text{g/mL}$ の抗CIおよび抗gH濃度で調製した。このQCプールの6つの反復を、個々に2つの連続した10倍希釈を使用して100倍に希釈して解析した。希釈は、2つの連続した10倍希釈を使用して調製した。表6に示したように、アッセイ内変動係数は、アッセイ内の反復測定について20%未満であり、および平均精度は、理論的な検体濃度の $\pm 20.0\%$ 以内であった。

【0250】

【表5】

抗体 実行 ID	抗 CI				抗 gH			
	IA-0	IA-1	IA-2	IA-3	IA-0	IA-1	IA-2	IA-3
	($\mu\text{g/mL}$)				($\mu\text{g/mL}$)			
	0.108	0.238	1.60	16.8	0.0989	0.232	1.64	15.8
	0.124	0.227	1.65	17.3	0.109	0.229	1.44	13.3
	0.105	0.221	1.70	15.7	0.120	0.210	1.70	14.9
	0.109	0.222	1.66	16.4	0.108	0.225	1.75	13.3
	0.103	0.192	1.62	14.6	0.111	0.225	1.26	13.4
	0.105	0.211	1.72	16.1	0.116	0.217	1.50	15.5
N	6	6	6	6	6	6	6	6
理論的濃度	0.100	0.200	1.50	15.0	0.100	0.200	1.50	15.0
平均	0.109	0.219	1.66	16.1	0.111	0.223	1.55	14.4
S. D.	0.0078	0.0157	0.047	0.930	0.0073	0.0082	0.185	1.17
C. V. %	7.18	7.17	2.85	5.76	6.55	3.67	11.9	8.16
理論との差異%	9.02	9.30	10.5	7.66	10.7	11.5	3.20	-4.18
下限	0.0750	0.160	1.20	12.0	0.0750	0.160	1.20	12.0
上限	0.125	0.240	1.80	18.0	0.125	0.240	1.80	18.0

【0251】

【表 6】

抗体	抗 CI	抗 gH
実行 ID	QC 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	QC 4 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	676	559
	682	635
	595	748
	598	720
	649	671
	637	650
N	6	6
理論的濃度	600	600
平均	639	664
S. D.	37.4	66.7
C. V. %	5.85	10.1
理論との差異%	6.56	10.6
下限	480	480
上限	720	720

10

20

【0252】

少なくとも10人の異なる個体ロット/ドナー（添加されてない（SP）および内部標準のみを添加した（SP/IS）の両方）からのマトリックス試料を、アッセイ特異性を評価するために解析した。添加してない特異性試料については、内部標準の予想される滞留時間にて存在する任意の干渉するクロマトグラフィーのバックグラウンドピークの反応は、その内部標準を添加した特異性試料におけるその内部標準について決定される平均クロマトグラフィーの反応の5%未満であった。内部標準（群）のみを添加した特異性試料については、これらの試料において測定される反応比（干渉するバックグラウンドピーク反応/内部標準ピーク反応）は、実行する間に解析した定量化（LLOQ）CALおよびQCの許容される下限において対応する検体について決定された平均反応比率の20%未満であり、抗CIおよび抗gH両方についての許容されるアッセイ特異性を示している。

30

【0253】

アッセイ選択性を、低いQCレベルの標的検体（群）および使用のレベルの内部標準（群）を添加した、10人の異なる個体ロット解析によって評価した。これらの試験試料は、SP Fとして同定される。アッセイ内変動係数は、反復測定について20%未満であり、および平均精度は、抗CIの全ての試験試料について（表7）、および抗gHの9/10の試験試料について（表8）、理論的な検体濃度の $\pm 20.0\%$ 以内であり、両方の抗体について許容されるアッセイ選択性を確認する。

40

【0254】

【表 7】

試料 ID	SPF 1	SPF 2	SPF 3	SPF 4	SPF 5	SPF 6	SPF 7	SPF 8	SPF 9	SPF 10
	0.189	0.157	0.215	0.182	0.184	0.182	0.167	0.178	0.218	0.186
	0.171	0.193	0.204	0.183	0.224	0.182	0.178	0.166	0.185	0.194
	0.211	0.217	0.228	0.192	0.15	0.204	0.22	0.186	0.19	0.202
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
理論的濃度	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
平均	0.19	0.189	0.216	0.186	0.186	0.189	0.188	0.177	0.198	0.194
S.D.	0.0199	0.0305	0.0121	0.0052	0.037	0.0126	0.0278	0.0099	0.0175	0.0079
C.V. %	10.5	16.1	5.59	2.82	19.9	6.65	14.8	6.62	8.87	4.09
理論との差異 %	-4.91	-5.52	7.76	-7.17	-7.02	-5.38	-5.92	-11.7	-1.23	-2.83
下限	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
上限	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24

10

20

【 0 2 5 5 】

【表 8】

試料 ID	SPF 1	SPF 2	SPF 3	SPF 4	SPF 5	SPF 6	SPF 7	SPF 8	SPF 9	SPF 10
	0.201	0.152	0.221	0.161	0.213	0.191	0.191	0.157	0.179	0.201
	0.189	0.265	0.217	0.23	0.202	0.199	0.185	0.172	0.187	0.238
	0.156	0.193	0.175	0.219	0.175	0.225	0.193	0.249	0.204	0.204
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
理論的濃度	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
平均	0.182	0.204	0.205	0.204	0.196	0.205	0.19	0.193	0.19	0.214
S.D.	0.0231	0.0572	0.0255	0.0369	0.0194	0.0176	0.0045	0.0495	0.0127	0.0207
C.V. %	12.7	28.1	12.5	18.1	9.89	8.58	2.38	25.7	6.68	9.69
理論との差異 %	-9.03	1.78	2.34	1.78	-1.75	2.47	-5.17	-3.74	-5.05	7
下限	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
上限	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24

30

40

【 0 2 5 6 】

サインペプチドのSIL ISを添加した試料について検体間干渉チェックを評価した。このアッセイにおいて測定された個体検体に対応する代替サインペプチドは、アッセイ手順を使用して独立して生成することができないため、同じ個体検体サインペプチド間のクロス検体干渉評価は、抗CIまたは抗gHを添加した試料については評価しなかった。むしろ、抗CIに対応するサインペプチドと抗gHに対応するサインペプチドとの間のクロス検体干渉を評価した。各内部標準を、その他の検体および内部標準に対するシグナルの寄与の可能性について個々にチェックした。対照マトリックス試料(「AI」)は、使用の予想されるレベルにて1つの内部標準のみを添加し、3回解析した。その予想される滞留時間にて存在す

50

るクロマトグラフィーピークからの検体の反応に対する寄与を、実行の間に解析した許容されるLLOQ CALsおよび/またはLLOQ QCsにおいてその検体について決定した平均クロマトグラフィー反応の20%未満であることが必要であった。内部標準の予想される滞留時間にて存在する干渉クロマトグラフィーバックグラウンドピークの反応は、定量化 (ULOQ) CALの許容される上限におけるその内部標準およびその内部標準を添加し、かつ実行の間に解析した高レベルQCについて決定した平均クロマトグラフィー反応の5%未満であることが必要であった。全体的に、有意でない検体間干渉が、抗CIおよび抗gHのサインペプチドのSIL ISを添加した試料について観察された。

【0257】

クリオフリーザー凍結/解凍安定性を、少なくとも3回の凍結/解凍サイクルにQCを供することにより、低および高QC濃度にて評価した。レベルあたり少なくとも6回の反復を解析した。凍結/解凍試料の変動係数は、反復測定について20%以下であり、および平均精度は、理論的な濃度の±20%以内であり、抗CIおよび抗gH両方について許容される凍結/解凍安定性を示している。

【0258】

前述の発明は、理解の明快さの目的のために例証および実施例により、いくらか詳細に記述したが、記述および実施例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきでない。本明細書において引用される全ての特許、および科学文献の開示は、参照によってこれらの全体において明白に組み込まれる。

10

【図1】

重鎖：マウス生細胞系に対して整列させたマウス抗体

Kabat 番号 4567891011121314151617181920212223242526272829303132333435 363738394041424344
 IGW154703 L00S6AELVYRPGTGVKVSCKASGYSKAFYNYLLE...WVKORPGCG
 MW65842581015 UYJLQ0SGAELVYRPGTGVKVSCKASGYSKAFYNYLLE...WVKORPGCG

Kabat 番号 464748495051525354555657585960616263646566676869707172737475767778798081828384
 IGW154703 LEWIGVYIHP...GGGGYXYVEKFKGKATLTAOKSSSTAYMQLSSLTS
 MW65842581015 LEWIGVYIHP...GGGGYXYVEKFKGKATLTAOKSSSTAYMQLSSLTS

Kabat 番号 7888909192939495969798 99100101102103104105106107108109110111112113
 IGW154703 UJSAVYFCA...YMYFDVWGGAGTTVTYSS 15HU10102
 MW65842581015 UJSAVYFCA...YMYFDVWGGAGTTVTYSS

IGHD:見用されなかった

【図2】

軽鎖、カッパ：マウス生細胞系に対して整列させたマウス抗体

Kabat 番号 123456789101112131415161718192021222324252627282930313233343536
 MW539701 DIVMTOSPAT...SVTPGDRVLSLSDRASO...SLSJY...HWY
 MW65842581015 DIVMTOSPAT...SVTPGDRVLSLSDRASO...SLSJY...HWY

Kabat 番号 3738394041424344454647484950515253545556575859606162636465666768697071
 MW539701 QKSHESPHLL...KYASGS...ISGIPSRFSGSGSDF
 MW65842581015 QKSHESPHLL...KYASGS...ISGIPSRFSGSGSDF

Kabat 番号 72737475767778798081828384858687888990919293949596979899100101102103104105106107
 MW539701 TLSINSEPEFVGVYVYCVYGHSP...YTFGGTKLEIK 64201
 MW65842581015 TLSINSEPEFVGVYVYCVYGHSP...YTFGGTKLEIK

【 図 3 】

重鎖：マウス生卵細胞系に対して整列させたマウス抗体

Kabat 番号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44

IGH1:50*CI 0 V L L O O P G A E L V K P G A S Y K L S C K A S I G Y T F T S Y W M Q I W V K O R P G O G

IMMSJ:09:3E:11 0 V L L O O S G A E L V P G A S Y K L S C K A S G Y T F T I Q Y W M A I T W V Q R P P G O G

COR-H1

Kabat 番号 45 46 47 48 49 50 51 52 A B C 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 A B C 83 84

IGH1:50*CI L E W I G E I D P S O S Y T Y Y O K F K G K A T L T V D I S S S T A Y M C L S S L T S

IMMSJ:09:3E:11 L E W I G A I D P S O S Y T T Y Y O Q I F K G K A L T V D E S S S S T A Y M C L S L T S

COR-H2

Kabat 番号 36 65 67 68 69 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

IGH1:50*CI E D S A V Y Y C A R I E E L C D K I O E T Q I T P A I S I G I P H Q H I T T I I T Q I S

IMMSJ:09:3E:11 E D S A V Y Y C A R I S G F P L F Y Y A M D Y W G O G T S V T V S S G H H Q I

COR-F3

(GH1):見出しなかった

【 図 4 】

軽鎖：ラムダ：マウス生卵細胞系に対して整列させたマウス抗体

Kabat 番号 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36

IGLV1*01 Q A V T O E S A T T S P G E I L T L C R S S I G A V T T S H Y F R W Y

IMMSJ:09:3E:11 Q A V T O E S A T T S P G E T V T L C R S S I G A V T T S H Y F R W Y

COR-L1

Kabat 番号 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 A B C D E 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 A B 67 68 69 70 71

IGLV1*01 Q E K P D H L F T G L I G S T M X R A P I G V P A R F S G S L I G D K A

IMMSJ:09:3E:11 Q E K P D H L F T G L I G S T M X R A P I G V P A R F S G S L I G D K A

COR-L2

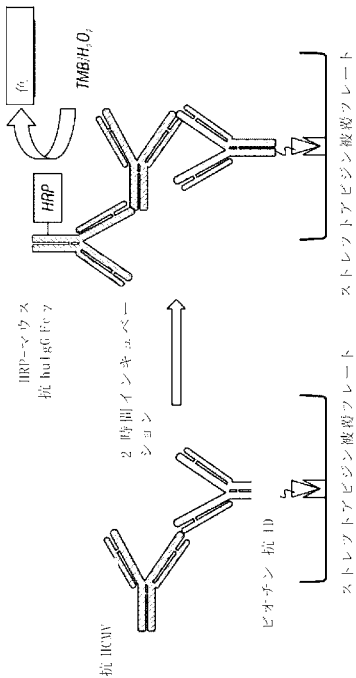
Kabat 番号 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107

IGLV1*01 A L T I T G A Q T E D E A I Y F C A L W Y S N H F W V F G G S T K L T V L

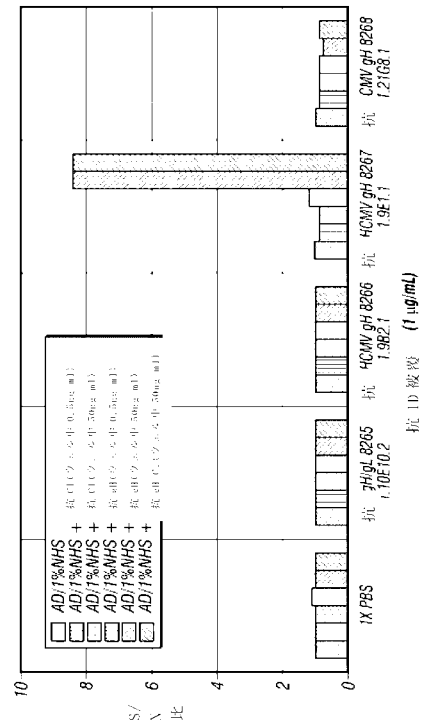
IMMSJ:09:3E:11 A L T I T G A Q T E D E A I Y F C A L W Y S N H F W V F G G S T K L T V L

COR-L3

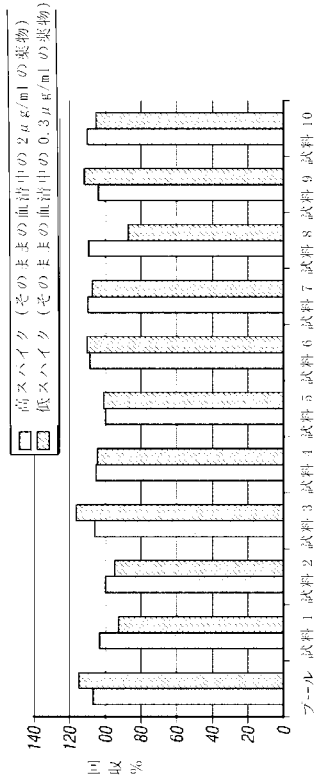
【 図 5 】



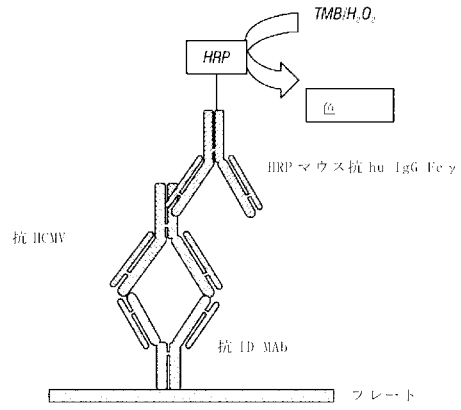
【 図 6 】



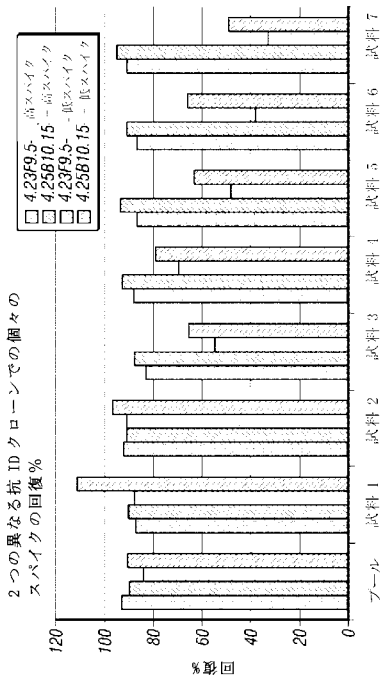
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2015518471000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/032661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/42 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TACKABERRY E S ET AL: "Monoclonal anti-idiotypes for the rapid detection of human cytomegalovirus", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 40, no. 2, 1 November 1992 (1992-11-01), pages 175-181, XP023697101, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/0166-0934(92)90066-M [retrieved on 1992-11-01] the whole document ----- -/--	1-52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 August 2013		Date of mailing of the international search report 27/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Pérez-Mato, Isabel

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/032661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>KEAY ET AL: "Syngeneic monoclonal anti-idiotype antibodies that bear the internal image of a human cytomegalovirus neutralization epitope.", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 140, no. 3, 1 February 1988 (1988-02-01), pages 944-948, XP055066121, ISSN: 0022-1767 the whole document</p> <p>-----</p>	1-52
Y	<p>TACKABERRY ET AL: "Anti-idiotypic mimicry of a neutralizing epitope on the glycoprotein B complex of human cytomegalovirus.", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 11, 1 November 1993 (1993-11-01), pages 6815-6819, XP055066110, ISSN: 0022-538X the whole document</p> <p>-----</p>	1-52
Y	<p>KEAY ET AL: "Anti-idiotype antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment.", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 65, no. 9, 1 September 1991 (1991-09-01), pages 5124-5128, XP055066222, ISSN: 0022-538X the whole document</p> <p>-----</p>	1-52
Y	<p>EP 0 119 629 A2 (NEW ENGLAND NUCLEAR CORP [US]) 26 September 1984 (1984-09-26) the whole document</p> <p>-----</p>	11-49
Y	<p>WO 2005/019271 A1 (WYETH CORP [US]; LUDWIG INST CANCER RES [US]; LIU ZHANQI [AU]; SCOTT A) 3 March 2005 (2005-03-03) the whole document</p> <p>-----</p>	13-21, 44-49
Y	<p>ERIC EZAN ET AL: "Bioanalysis of recombinant proteins and antibodies by mass spectrometry", THE ANALYST, vol. 134, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 825-834, XP055066259, ISSN: 0003-2654, DOI: 10.1039/b819706g the whole document</p> <p>-----</p>	22-43
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/032661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATHIEU DUBOIS ET AL: "Immunopurification and Mass Spectrometric Quantification of the Active Form of a Chimeric Therapeutic Antibody in Human Serum", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 80, no. 5, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 1737-1745, XP055066260, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac7021234 the whole document	22-43
Y,P	WO 2012/047732 A2 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; CHEN XIAOCHENG [US]; DENNI) 12 April 2012 (2012-04-12) the whole document	1-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/032661**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2013/ 032661

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 2, 4, 5, 8, 30-32, 51(completely); 1, 11-29, 37-50(partially)

directed to an anti-idiotypic antibody that binds to anti-HCMV antibody of SEQ ID NO:1 and 2 (VH and VL) and its use in methods of detection of said anti-HCMV antibody.

2. claims: 3, 6, 7, 9, 10, 33-36, 52(completely); 1, 11-29, 37-50(partially)

directed to an anti-idiotypic antibody that binds to anti-HCMV antibody of SEQ ID NO:3 and 4 (VH and VL) and its use in methods of detection of said anti-HCMV antibody.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/032661

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0119629 A2	26-09-1984	CA 1225590 A1	18-08-1987
		DK 164084 A	23-09-1984
		EP 0119629 A2	26-09-1984
		GR 81952 A1	12-12-1984
		JP 559180362 A	13-10-1984
		US 4536479 A	20-08-1985

WO 2005019271 A1	03-03-2005	AU 2004266216 A1	03-03-2005
		BR P10413575 A	17-10-2006
		CA 2535804 A1	03-03-2005
		CN 1867587 A	22-11-2006
		EP 1660538 A1	31-05-2006
		JP 2007528868 A	18-10-2007
		US 2008268459 A1	30-10-2008
		WO 2005019271 A1	03-03-2005

WO 2012047732 A2	12-04-2012	AR 083214 A1	06-02-2013
		AU 2011312425 A1	11-04-2013
		CA 2811087 A1	12-04-2012
		EP 2621533 A2	07-08-2013
		SG 188657 A1	31-05-2013
		US 2012082666 A1	05-04-2012
		WO 2012047732 A2	12-04-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 30/88 2 0 1 R

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . U N I X

- (72)発明者 シュイ, コーヤン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 マイア, マウリシオ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 ヴィジ, ラジェッシュ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 ワン, テレンス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 ロウ, ジョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 リー, イエンホン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1
- (72)発明者 リウ, ルナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 GA11
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50

专利名称(译)	抗HCMV独特型抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2015518471A	公开(公告)日	2015-07-02
申请号	JP2015503347	申请日	2013-03-15
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ホンゴジョアン シュイコーヤン マイアマウリシオ ヴィジラジェッシュ ワンテレンス ロウジョン リーイエンホン リウルナ		
发明人	ホンゴ, ジョ-アン シュイ, コーヤン マイア, マウリシオ ヴィジ, ラジェッシュ ワン, テレンス ロウ, ジョン リー, イエンホン リウ, ルナ		
IPC分类号	C07K16/42 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/543 G01N30/88		
CPC分类号	C07K16/4216 C07K16/088 C07K2317/56 C07K2317/92 G01N33/56994 G01N33/686 G01N2333/045 G01N2469/20		
FI分类号	C07K16/42.ZNA C12N15/00.A G01N33/53.N G01N33/543.545.A G01N30/88.J G01N30/88.201.R		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/GA11 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50		
優先権	61/616914 2012-03-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供抗独特型HCMV抗体及其使用方法。

(21) 出願番号	特願2015-503347 (P2015-503347)	(71) 出願人	509012625
(66) (22) 出願日	平成25年3月15日 (2013. 3. 15)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(65) 翻訳文提出日	平成26年11月26日 (2014. 11. 26)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
(66) 国際出願番号	PCT/US2013/032661		サンフランシスコ デイエヌエー
(87) 国際公開番号	W02013/148373		ウェイ 1
(87) 国際公開日	平成25年10月3日 (2013. 10. 3)	(74) 代理人	100109726
(31) 優先権主張番号	61/616, 914		弁理士 園田 吉隆
(32) 優先日	平成24年3月28日 (2012. 3. 28)	(74) 代理人	100101199
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 義教
		(72) 発明者	ホンゴ, ジョ-アン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			80, サウス サンフランシスコ, デ
			イエヌエー ウェイ 1